

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

## ESSAIS NÉGATIFS

### DE LA TRANSMISSION DE LA LÈPRE HUMAINE AU HAMSTER DE SYRIE, *CRICETUS AURATUS*

par E. MARCHOUX, V. CHORINE, A. CHABAUD et J. TISSEUIL (\*).

(*Institut Pasteur.*)

Après avoir éprouvé la sensibilité du hamster de Syrie aux bacilles tuberculeux humains et bovins, Balfour-Jones a montré que ces animaux inoculés avec le bacille de Stéfansky présentent une infection évolutive tout à fait comparable à celle qu'on observe chez le rat (1). Adler, sur les suggestions de Sir Patrick Laidlaw, a essayé d'infecter le hamster doré avec le bacille de Hansen. Les hamsters splénectomisés ont été infectés à deux reprises, d'abord par insertion d'un fragment de lépreux humain sous la peau de l'abdomen et ensuite par inoculation d'une émulsion de bacille de Hansen par voie intrapéritonéale. Au bout de six semaines, 3 sur 4 de ces animaux — le quatrième n'a pas pu être autopsié — auraient présenté une évolution apparente de la maladie. Au point de l'inoculation sous-cutanée la masse de germes trouvés en bon état a fait penser à une multiplication *in situ*. Quelques

(\*) Communication présentée à l'Ass. Micr. L. Française, séance du 2 octobre 1941.

(1) S. E. B. BALFOUR-JONES. *J. Path. and Bact.*, 45, n° 3, 1937, p. 739-

bacilles acido-résistants ont été vus dans le foie (2). Remarquons tout d'abord que la période d'incubation de six semaines est étonnamment courte pour une infection hansenienne.

Burnet, tout en confirmant les observations d'Adler, estime que la splénectomie n'augmente pas la sensibilité des hamsters à l'infection lépreuse (3). De telles réussites présenteraient un intérêt considérable pour l'étude de la lèpre humaine, car le manque d'animaux sensibles interdit pour ainsi dire toute recherche expérimentale sur cette affection. Etant donné l'importance du problème, nous avons été heureux de pouvoir entreprendre des essais de vérification sur les résultats signalés par les auteurs précités.

Grâce à l'obligeance du professeur Adler, qui a bien voulu nous envoyer un certain nombre de hamsters et à qui nous sommes heureux d'exprimer ici tous nos remerciements, nous avons pu réaliser un élevage de ces animaux à l'Institut Pasteur de Paris et en posséder finalement un nombre suffisant pour nous permettre de nombreuses inoculations.

Huit expériences ont été faites, chacune sur 5 hamsters. Parmi les hamsters inoculés avec le bacille de Hansen, 25 non splénectomisés ont été inoculés par voie sous-cutanée : 10 de ces animaux avec une émulsion de lépromes et 15 autres par introduction sous-cutanée de petits fragments de lépromes humains. 5 autres hamsters, aussi non splénectomisés, ont été inoculés par voie intrapéritonéale avec le produit de broyage d'un léprome. Enfin, 10 animaux qui ont subi l'ablation de la rate, ont été infectés par insertion de petits fragments de lépromes par voie sous-cutanée. Nous exposerons brièvement ces expériences, qui toutes ont donné des résultats sensiblement comparables. Chez aucun animal nous n'avons pu observer une multiplication certaine des germes introduits et encore moins une généralisation vraie de la maladie. Les hamsters de Syrie, entre nos mains, se sont montrés tout aussi peu sensibles à la lèpre humaine que le rat blanc.

Voici les protocoles de nos expériences que nous allons

(2) S. ADLER. *Lancet* du 18 septembre 1937, p. 714-715.

(3) E. BURNET. *C. R. Acad. Sc.*, **207**, 1938, p. 690-692 et *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, **27**, n° 4, 1938, p. 327-340.

exposer groupées suivant le mode d'infection des animaux.

Nous commençons par les expériences faites sur les animaux non splénectomisés et inoculés par voie sous-cutanée avec un broyage de lépromes humains.

EXPÉRIENCE N° 1.350, faite le 28 avril 1938. — Un lépromes volumineux de 2 centimètres de longueur sur 1 centimètre de largeur et de 1 à 2 centimètres d'épaisseur suivant les endroits, prélevé juste avant l'inoculation, est broyé dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. Les frottis de cette émulsion sont très riches en bacilles acido-résistants pour la plupart groupés en globies. 5 hamsters, 1 adulte et 4 jeunes sont inoculés sous la peau de l'aîne droite, chacun avec 1 cent. cube de cette suspension. L'animal adulte est une femelle, elle met bas 2 petits bien portants le 1<sup>er</sup> juin 1938. Une autre femelle jeune met bas le 18 août et une troisième, de 10 petits, le 16 septembre de la même année. Les examens répétés jusqu'au mois d'octobre ne révèlent aucun symptôme pathologique. Il ne se produit même pas de réaction locale au point d'inoculation. Le 8 octobre, on prélève chez les 2 hamsters, endormis à l'éther, le tissu adipeux de l'aîne droite contenant la chaîne des ganglions lymphatiques inguinaux voisins du point d'inoculation. Chez le premier hamster, l'examen est négatif. Dans le tissu adipeux du deuxième animal on trouve 3 ganglions contenant de très rares bacilles acido-résistants fortement granuleux. La moitié du ganglion le plus volumineux sert pour la recherche des bacilles, l'autre moitié avec le tissu environnant est broyé dans 4 cent. cubes d'eau physiologique et cette émulsion est utilisée pour inoculer par voie sous-cutanée 2 rats blancs et 1 hamster à raison de 1 cent. cube par rat et 2 cent. cubes pour le hamster. L'émulsion est très pauvre en germes, on en trouve à peine 1 tous les 50 champs de microscope. Ces animaux ainsi inoculés n'ont jamais présenté de lésions et on n'a pas retrouvé de bacilles à l'autopsie. Un rat a été examiné neuf mois, l'autre rat et le hamster onze mois après l'inoculation.

Les animaux inoculés le 28 avril sont régulièrement surveillés jusqu'au mois de février 1939, autrement dit pendant plus de neuf mois et ils n'ont pas présenté de lésions apparentes. Le 1<sup>er</sup> février 1939, on sacrifie un hamster, l'examen du tissu conjonctif au point d'inoculation et de tous les ganglions superficiels ne nous permet pas de trouver un seul bacille acido-résistant. Le 7 février 1939, on sacrifie 3 autres animaux et, le 8 février, le dernier hamster. Deux de ces animaux avaient été opérés le 8 octobre ; on ne trouve chez eux, au point d'inoculation, aucun signe d'infection. Chez les 2 autres, par examen des ganglions au point d'inoculation, on rencontre de très rares bacilles acido-résistants. La recherche de bacilles acido-résistants dans le tissu conjonctif au point d'inoculation, dans les ganglions axillaires des deux côtés, dans les ganglions inguinaux gauches, dans la rate et dans le foie reste complètement négative chez les 4 hamsters.

EXPÉRIENCE N° 1.381, faite le 24 août 1938. — Comme dans l'expérience précédente, on inocule 5 hamsters adultes avec un broyage de lépromes humains. L'émulsion est extrêmement riche en germes, c'est une purée



de bacilles acido-résistants. L'inoculation est faite sous la peau de l'aîne droite à raison de 0 c. c. 5 par animal.

Les examens répétés des animaux à des intervalles réguliers ne révèlent la présence d'aucune lésion au point d'inoculation ou ailleurs. Il est à remarquer que chez ces animaux, il est difficile de se rendre compte s'il existe de petits nodules inguinaux ; ils sont si gras que les ganglions, même augmentés de volume, enfouis dans le tissu adipeux restent impalpables.

Le premier animal meurt le 6 février 1939, presque cinq mois et demi après l'inoculation. A l'autopsie on trouve les ganglions superficiels de taille normale. Les frottis de ces ganglions nous révèlent la présence de nombreux bacilles dans les ganglions inguinaux droits voisins du point d'inoculation, plusieurs intracellulaires, un certain nombre libres. Si l'on eût été moins prévenu de la richesse de l'inoculation, on eût pu penser à un développement des germes, mais le nombre des bacilles de Hansen inoculé a été tellement grand qu'on ne peut songer ici à une telle hypothèse, mais plutôt à une conservation des microbes qui parfois se digèrent très lentement dans l'organisme. Sur les frottis des ganglions axillaires droits, on trouve de rares bacilles acido-résistants. Dans les ganglions axillaires gauches, nous avons trouvé, après recherche minutieuse, un seul bacille. Les autres ganglions, ainsi que le foie et la rate, sont dépourvus de germes. Un autre animal meurt le même jour, mais il est dévoré par ses congénères.

Les autres animaux, ne présentant aucun signe d'infection, sont conservés jusqu'au 5 septembre, date à laquelle ils sont sacrifiés. A l'autopsie de ces animaux, quelques bacilles ont été découverts dans les ganglions inguinaux droits voisins du point d'inoculation, mais ils sont déjà beaucoup moins nombreux que chez le premier animal examiné sept mois auparavant.

Il ressort de ces deux expériences que l'inoculation sous-cutanée d'une émulsion de bacilles de Hansen à des hamsters ne produit pas de lésions évolutives, les bacilles sont peu à peu détruits dans l'organisme. Quant à la présence de bacilles dans des organes éloignés du point d'inoculation, elle n'indique aucunement un début de généralisation, car Souza-Araujo, après inoculation de bacilles de Hansen morts, a trouvé des germes intracellulaires dans le foie et dans la rate (4).

Voici à présent une des trois expériences d'inoculation de hamsters dorés non splénectomisés par insertion de morceaux de léprome humain sous la peau.

EXPÉRIENCE N° 1.418, faite le 23 novembre 1938. — Un léprome est

(4) H. C. SOUZA-ARAÚJO. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, **24**, n° 6, p. 577-598.

coupé immédiatement après le prélèvement en morceaux gros comme un petit pois. Par une boutonnière faite au niveau du flanc droit on introduit chez chaque animal un de ces morceaux de lépromes. 5 hamsters ont été ainsi traités. La boutonnière est ensuite fermée avec une agrafe.

Au mois de janvier 1939, les animaux ont gardé encore l'agrafe, ce qui indique que les morceaux n'ont pas été éliminés. On constate par palpation que le volume de la greffe a diminué, elle est partiellement résorbée chez les 5 hamsters.

Un animal meurt le 27 mars, un peu plus de quatre mois après l'opération. A l'autopsie, on ne constate aucune lésion macroscopique et, à l'ouverture de la peau, on ne trouve plus trace du lépromes introduit, tout est résorbé ou éliminé. La recherche des bacilles dans le tissu sous-cutané et dans les ganglions voisins du point d'inoculation reste sans résultats. Un autre animal est mort le 6 avril 1939, sensiblement quatre mois et demi après le commencement de l'expérience ; les résultats de l'autopsie sont identiques à ceux du hamster précédent. Les autres animaux restent en bon état jusqu'au 1<sup>er</sup> septembre 1939, date à laquelle ils sont sacrifiés ; les résultats d'autopsie sont les mêmes pour ces 3 derniers animaux que pour les 2 premiers.

Les résultats des autres expériences faites dans les mêmes conditions se confondent avec ceux que nous venons d'exposer.

Chez aucun animal nous n'avons pu observer une multiplication des germes. Quand la greffe n'a pas été entièrement digérée, on trouve des bacilles acido-résistants parfois très nombreux. Des travailleurs que n'ont pas déçu de longues années de recherches infructueuses sur la lèpre peuvent croire à une multiplication des germes, tandis qu'en réalité il ne s'agit que de la conservation de microbes inoculés. Il est très difficile d'évaluer le nombre des germes dans de telles lésions. Quelques bacilles vivants ou morts peuvent être même transportés par les phagocytes assez loin du point d'inoculation, sans qu'on puisse conclure à une lésion évolutive. Ce qui varie d'un animal à l'autre, c'est le temps de conservation de la greffe ; cependant, chez tous les animaux, elle finit par se résorber et les bacilles par être digérés peu à peu.

Nous avons fait aussi une expérience sur des animaux non splénectomisés et inoculés avec un broyage de lépromes humains par voie intrapéritonéale.

EXPÉRIENCE n° 1.351, faite le 28 avril 1938. — Avec la même émulsion qui nous a servi pour notre première expérience n° 1.350, rapportée plus haut, nous avons inoculé 5 hamsters dorés dans la cavité péritonéale à raison de 1 cent. cube par animal. Ces animaux n'ont jamais



présenté aucune manifestation pathologique qu'on pût attribuer au bacille de Hansen. On sacrifie un premier animal le 28 janvier 1939, neuf mois après l'inoculation. On constate que tous les organes internes sont en bon état. Le mésentère est fixé sur lame et, après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen on y trouve un seul bacille. L'épiploon traité de même se montre indemne de toute infection. Dans les frottis faits avec le produit de grattage de la capsule de Glisson, on ne découvre pas de bacilles acido-résistants. Le foie est négatif, dans la rate, on trouve deux bacilles. Les 4 autres animaux sont sacrifiés dix jours plus tard. La recherche des bacilles dans les ganglions superficiels et profonds, dans le mésentère et dans l'épiploon reste négative. On trouve de très rares bacilles dans le foie chez 1 animal et dans la rate de 2 autres.

Par conséquent, quand les bacilles sont introduits dans la cavité péritonéale des animaux sous forme d'émulsion, plus facilement résorbée qu'un fragment, les bacilles sont rapidement digérés par l'organisme. Aucune lésion évolutive ne se produit.

Enfin, les deux dernières expériences ont été faites sur des animaux splénectomisés. Nous sommes heureux de remercier ici M<sup>lle</sup> Ashbel qui a bien voulu appliquer devant nous la technique de splénectomie employée par le professeur Adler. Ces deux expériences n'ont pas été plus heureuses que les précédentes, les animaux n'ont présenté aucun signe d'infection. Voici, à titre d'exemple, l'une d'elles :

EXPÉRIENCE N° 1.486, faite le 6 juin 1939. — Après ablation de la rate chez 5 hamsters endormis à l'éther, on introduit sous la peau par une boutonnière pratiquée au flanc droit de l'animal, un morceau de léprome humain gros comme un petit pois. La plaie est ensuite refermée avec un point de soie. 2 cobayes non splénectomisés ont été infectés de la même façon pour permettre de dépister la présence possible de bacilles tuberculeux. Ajoutons de suite que ces 2 cobayes ont survécu à cette petite intervention sans jamais présenter de lésions tuberculeuses. 1 hamster meurt vingt-quatre heures après l'opération. Un mois après le commencement de l'expérience, on sent chez les 4 animaux un petit grain de plomb au point d'inoculation. Cependant le léprome ne persiste pas, on ne trouve plus trace du greffon à l'autopsie d'un animal mort le 24 juillet, quarante-huit jours après le commencement de l'expérience. Un autre animal meurt le 7 août 1939, soixante-deux jours après l'opération ; chez lui on retrouve un reste du léprome, mais les bacilles acido-résistants y sont rares, la plupart ont été déjà détruits par l'organisme. Les ganglions du voisinage sont libres de bacilles, les organes internes indemnes de toute infection. Enfin, les 2 derniers animaux sont sacrifiés le 5 septembre 1939 ; on ne trouve chez eux ni trace du léprome, ni bacilles.

La deuxième expérience, qui a duré dix mois, a donné des résultats identiques.

Comme dans la série d'expériences précédentes, la conservation plus ou moins longue du greffon peut donner lieu à une certaine confusion, par résorption plus ou moins rapide et concentration des bacilles sous un petit volume.

#### CONCLUSIONS.

1° Le hamster de Syrie, *Cricetus auratus*, inoculé soit par voie sous-cutanée, soit par voie intrapéritonéale avec des bacilles de Hansen n'a présenté entre nos mains aucune lésion évolutive de lèpre. Les bacilles inoculés sont peu à peu digérés par l'organisme.

2° La splénectomie ne rend pas les hamsters plus sensibles aux bacilles lépreux.

3° Quand on introduit les bacilles sous forme de greffe, la lyse du léprome se produit plus ou moins rapidement. Dans certains cas, la persistance du greffon contenant de nombreux bacilles, dont un certain nombre peuvent être véhiculés à distance, donne une apparence de multiplication des germes et de généralisation de la maladie.

4° Seule la persistance de greffes lysées plus lentement que les autres a pu faire croire à la sensibilité du hamster doré de Syrie au bacille de Hansen.

# ALTÉRATION DU BACILLE DE HANSEN PAR LES FIXATEURS ROLE PROTECTEUR DE L'ACIDE PHÉNIQUE

par A. CHABAUD (\*).

(Institut Pasteur, Service de M. le Professeur MARCHOUX.)

Quand on envoie à un laboratoire des tissus lépreux conservés dans un fixateur acide, il est habituel, si le contact dure longtemps, que l'examen des coupes ne permette plus d'y révéler le germe spécifique par la méthode de Ziehl.

## I. — Mécanisme de la perte de la colorabilité.

Prenons une pièce initialement reconnue comme fourmillant de bacilles de Hansen bien colorables par la fuchsine ; fixons-la dans le plus usuel des liquides fixateurs, le Bouin alcoolique, dit encore Duboscq Brasil (1), et suivons le sort des bacilles au cours de la fixation, par la méthode de la coloration de Ziehl

Parfois dès le cinquième jour, souvent au bout de quatre semaines et presque toujours vers la huitième semaine — car il faut tenir compte de l'action variable de différents échantillons de Bouin — la coloration de Ziehl ne met en évidence que des grains violets, presque noirs, disséminés dans une couche de rouge vif. Ces grains, de diagnostic difficile, ne peuvent cependant être confondus ni avec le pigment ocre

(\*) Communication présentée à l'Ass. Micr. L. Française, séance du 2 octobre 1941.

(1) Ce fixateur bien connu n'est autre que le mélange constitué au moment de l'emploi par les trois liquides, alcool picriqué (1 gramme d'acide picrique dans 150 cent. cubes d'alcool à 80°), formol du commerce, 60 cent. cubes, acide acétique cristallisable, 15 cent. cubes.



retrouvé dans certaines cellules lépreuses, ni avec le pigment du corps muqueux de Malpighi de l'épiderme des Noirs. Mais que l'on attende et bientôt les coupes apparaissent vides de germes, laissant tout au plus deviner quelques taches rouges et parfois des granules mal teintés.

Cependant les bacilles existent ; une surcoloration par le Gram les met en évidence. Encore ne se retrouvent-ils pas, ainsi que sur les lames témoins, sous une forme généralement bacillaire ; ici, ce sont des grains Gram positif, séparés les uns des autres par un intervalle clair et dont l'écartement permet d'imaginer la continuité du bacille. Du reste, cette transformation granulaire connue depuis longtemps, avait fait donner par Unna et Lutz le nom de « *Coccothrix* » au bacille de Hansen.

Mais poursuivons l'expérience et colorons classiquement par le Ziehl vers la dixième semaine. Aucun germe rouge n'est décelable. Surcolorons alors, en chauffant quinze à vingt minutes vers 120° et passons rapidement par l'acide azotique et l'alcool. Nous apercevons sur un fond rouge violet nécessairement mal différencié, des granules violet noir peu discernables, bleuisant après une coloration de fond au bleu de méthylène.

Parallèlement, baignons dans du Bouin alcoolique des lames chargées de bacilles de Hansen.

Que le suc cellulaire tapissant la lame et bourré de bacilles soit desséché depuis huit jours ou trois ans, l'évolution de la colorabilité reste au début superposable à celle des germes dans les coupes et c'est d'abord une atténuation progressive de la belle coloration rouge des bacilles. Mais, coïncidant vers la quatrième ou cinquième semaine avec la mise en évidence des granules dans les coupes, un fait nouveau apparaît. En effet, sur lames, on ne remarque pas d'autres granulations que celles retrouvées dans de si nombreux bacilles ; mais ces grains eux-mêmes et les germes bacillaires vont disparaître de la quatrième à la huitième semaine : c'est un véritable nettoyage de germes. Pourtant, la pellicule de suc cellulaire enrobant les germes reste aussi dense ; elle contient les mêmes débris cellulaires que les lames témoins ; mais la coloration de fond au bleu ne dessine que des fantômes de bacilles. Comme

il ne peut être invoqué une action mécanique (agitation ou nombreuses manipulations), il faut que les germes se soient décollés d'eux-mêmes pour tomber.

## II. — Etude de quelques facteurs susceptibles d'altérer le bacille de Hansen.

Neuf séries d'expériences ont été entreprises, chacune comportant l'examen de frottis de lépromes humains desséchés à l'air, les uns datant de huit jours, les autres de trois ans. Ces lames étaient mises dans différents bains dont on ne les sortait que pour les colorer. Une technique uniforme de coloration a été adoptée dont voici les temps :

Ziehl à 115-120° . . . . . 6 minutes

sur plaque horizontale chauffante. Recharger en fuchsine dès menace de dessiccation :

Refroidissement . . . . .	4 minutes.
Ziehl à 115-120° . . . . .	3 minutes.
Refroidissement . . . . .	3 minutes.
Lavage rapide dans un bain contenant de l'eau du robinet.	
NO <sup>3</sup> H au 1/10 . . . . .	50 secondes.
Alcool absolu . . . . .	2 aller et retour.
Lavage dans un bain contenant de l'eau du robinet pour enlever l'alcool. . . . .	1 minute.
Bleu de méthylène au 1/10. . . . .	50 secondes.
Lavage dans un bain d'eau du robinet.	
Séchage à l'étuve.	

### ALTÉRATIONS DUES :

#### *Aux acides. Expérience n° 1.*

Les acides étudiés ont été : acides chlorhydrique, azotique, acétique, citrique en solution normale ; acide picrique à saturation dans l'eau.

Au dixième jour, coloration très affaiblie pour les lames baignant dans HCl, NO<sup>3</sup>H ; au quinzième, pour acide acétique ;

au vingtième, faible diminution pour acide picrique, moindre encore pour acide citrique.

*Aux trois solvants histologiques des graisses :  
alcool à 100°, xylène, paraffine fondue à 57°. Expérience n° 2.*

Au vingtième jour, l'alcool absolu altère peu la colorabilité, alors que le xylène et la paraffine la gênent.

*A ces trois solvants, après attaque par les acides  
étudiés dans l'expérience n° 1. Expérience n° 3.*

1° Attaque par les acides de un à trente jours, puis bain de six heures dans l'un des trois solvants. La colorabilité diminue — et le nombre de germes — d'autant plus rapidement que l'acide employé est plus fort : HCl,  $\text{NO}^3\text{H}$ , puis acide acétique et acide picrique, puis acide citrique et davantage après un bain de xylène ou de paraffine qu'après alcool.

2° Attaque par les acides de un à trente jours, puis triple passage dans l'alcool, le xylène et la paraffine (deux heures dans chaque bain).

La colorabilité est plus défectueuse que dans le lot 1 ; elle varie aussi selon la force des acides. On note une augmentation des germes arrachés au cours de cette triple manipulation, surtout après déparaffinage par le xylène. Les bacilles sont du reste retrouvés dans les bains centrifugés.

*Aux constituants du Bouin. Expérience n° 4.*

Alcool à 80°, alcool picriqué (1 gramme d'acide picrique pour 450 cent. cubes d'alcool), acide acétique (15 cent. cubes d'acide pour 226 cent. cubes d'alcool à 80°), formol du commerce (60 cent. cubes de formol à 40 p. 100 pour 226 cent. cubes d'alcool à 80°). Au sortir du bain de l'un de ces constituants, les lames sont plongées successivement ou non dans l'alcool à 100°, le xylène et la paraffine pour deux heures chaque fois.

Au vingtième jour, la coloration est peu atténuée, sauf après passage par les trois colorants.



*A l'aldéhyde formique à 66/226, neutralisé ou non, suivi ou non des trois solvants. Expérience n° 5.*

Affaiblissement au vingtième jour de la colorabilité, notamment après les trois solvants et davantage pour le formol acide.

*Aux différents fixateurs. Expérience n° 6.*

- 1° Hollande, Zencker avec ou sans acide acétique ;
- 2° Sublimé, acétate de soude ;
- 3° Différents échantillons de Bouin alcoolique.

Ces différents fixateurs, franchement acides ou proches de la neutralité, n'empêchent pas la diminution progressive de la colorabilité qui se remarque dès la troisième semaine. Dans tous les cas, les fixateurs riches en acide provoquent un affaiblissement plus net, surtout après passage par les trois solvants. L'action défavorable des Bouins varie d'un échantillon à l'autre.

Vers la huitième semaine, les lames sont vides de leurs bacilles que l'on retrouve par centrifugation au fond des bains, et ceci avant leur passage par les trois solvants.

*Au pH. Expérience n° 7.*

Les différents échantillons de Bouin étudiés avaient pour pH de 1,4 à 1,6. Celui à pH 1,4 diminuait le plus la colorabilité et activait la chute des germes. Ce Bouin alcoolique est tamponné par de l'acétate de soude de façon à obtenir les pH suivants :

Bouin + acétate de soude 1 p. 100 . . . . .	pH 4,4
Bouin + acétate de soude 3 p. 100 . . . . .	pH 5,0
Bouin + acétate de soude 5 p. 100 . . . . .	pH 5,2

Après les bains successifs de deux heures dans chacun des trois solvants des graisses, le Bouin tamponné à 3 p. 100, pH 5, permet à la troisième semaine une meilleure coloration que les Bouins à pH 1,4 et 4,4.

*Au Bouin alcoolique. Expérience n° 8.*

Cette étude a été en partie faite dans le premier chapitre de ce travail. Il convient d'insister sur le rôle du pH (exp. n° 7). De plus, nous notons que dès les septième et huitième semaines, les lames ont sensiblement perdu la même quantité de bacilles, après passages ou non par les trois solvants ; qu'elles en sont dénuées à la neuvième semaine.

*Rôle de l'acide phénique. Expérience n° 9.*

Nous avons coloré par le Ziehl des bacilles de Hansen d'un mucus nasal conservé en tube scellé depuis quatre ans dans une solution d'acide phénique d'environ 0,5 p. 100. Ce procédé, préconisé depuis de longues années par M. Marchoux, offre l'avantage de conserver les bacilles lépreux, en empêchant la flore bactérienne associée. Nous avons été étonné de la bonne colorabilité de ces germes.

De même, des bacilles fraîchement étalés sur lames puis desséchés à l'air se colorent aussi bien que les bacilles témoins et ceci : dans des bains d'eau ou d'alcool à 80° ou à 90° contenant de 0,5 à 20 p. 100 d'acide phénique et après quatre mois et seize jours (cent trente-six jours). De plus, on ne note pas une diminution appréciable du nombre de germes.

Par contre, l'acide phénique ajouté de 0,5 à 20 p. 100 à des fixateurs picriqués ne favorise pas la coloration des germes et n'empêche pas leur décollement.

**III. — Choix d'un fixateur.**

Une fois reconnue l'action de l'acide phénique qui conserve un long temps les cires du bacille de Hansen et par conséquent leur colorabilité par la méthode de Ziehl, il s'agissait de combiner cet acide, par lui-même peu mordant et pénétrant, à d'autres produits capables d'assurer une bonne fixation des tissus.

Dans une première série d'essais, la phénolisation de 1 à

20 p. 100 d'un Bouin alcoolique ou d'un Bouin tamponné de 1 à 5 p. 100 par l'acétate de soude, ne donna que des résultats peu encourageants.

Une deuxième série de fixateurs à l'eau fut entreprise où, tour à tour faisant varier les différentes proportions de ces corps, on adjoignit à l'acide phénique du formol, neutralisé ou non, du tanin, puis du sel ou du sucre afin d'éviter la lyse des hématies. Mais ces milieux ne présentaient aucune des qualités d'un bon fixateur, même après addition d'acides particulièrement pénétrants, tels les acides acétique ou trichlor-acétique.

Enfin, dans un troisième temps, l'usage d'alcool phénolé permit de constituer un fixateur compatible aux usages de l'anatomo-pathologie. Après de très nombreux tâtonnements, la formule la meilleure parut être la suivante :

*Fixateur n° 17.* pH = 2,4 :

Alcool à 80° . . . . .	60 cent. cubes.
Acide phénique . . . . .	15 grammes.
Formol du commerce . . . . .	5 cent. cubes.
Acide acétique. . . . .	2 cent. cubes.

Ce milieu — et c'est là le but même de ce travail — devait permettre une bonne colorabilité des bacilles de la lèpre en dépit d'une longue conservation dans le fixateur. L'expérience le démontra qui consista à fixer des échantillons d'un même léprome d'une part dans différents Bouins alcooliques, d'autre part dans ce nouveau fixateur. A la huitième semaine (cinquante-cinq jours) les lépromes fixés au Bouin ne présentaient aucun germe, après coloration par un Ziehl, alors que ceux conservés quatre mois et seize jours (cent trente-six jours) dans le fixateur phénolé fourmillaient de bacilles bien colorés.

### Conclusions.

1° Une longue fixation d'un léprome humain dans le Bouin alcoolique altère les bacilles à ce point qu'ils ne se colorent que difficilement ou même plus du tout par la méthode de Ziehl.



2° Les facteurs principaux de l'altération semblent dépendre de l'action du formol et des sels des métaux lourds et surtout de l'acidité du fixateur suivie du maintien prolongé des bacilles dans les solvants histologiques des graisses : alcool, xylène, paraffine fondue.

3° L'acide phénique retarde l'altération du bacille de Hansen.

4° Les bacilles d'un léprose humain restent bien colorables après un séjour de quatre mois et seize jours (cent trente-six jours) dans un fixateur phéniqué.

# RECHERCHES SUR LA FRÉQUENCE DES DIFFÉRENTS TYPES DE BACILLES TUBERCULEUX DANS L'INFECTION SPONTANÉE DU CHAT

par J. VERGE et F. SENTHILLE (\*).

(Ecole vétérinaire d'Alfort. Laboratoire de microbiologie.)

Dès qu'il fut admis que le bacille tuberculeux des Mammifères reconnaissait un type humain et un type bovin, de nombreux auteurs recherchèrent la fréquence respective de ces deux types dans l'infection spontanée de l'homme et des diverses espèces animales. Ces travaux, qui présentent un intérêt certain dans le cas particulier de la tuberculose féline, ont permis de discerner, d'une part l'origine de la contagion et la voie de pénétration du germe, d'autre part le danger que le chat tuberculeux représente pour son entourage.

Les essais effectués dans ce but, depuis 1921, par une pléiade d'auteurs, au premier rang desquels il faut citer Stanley Griffith, Dobson, van Goidsenhoven et Schœnaers, portent sur un total de 116 souches de bacilles tuberculeux, parmi lesquelles 110 appartiennent au type bovin et 6 seulement au type humain.

Du mois d'octobre 1940 au mois de mai 1941, il nous a été donné d'isoler 10 souches de bacilles de Koch sur les cadavres de chats infectés et hospitalisés dans notre service.

TECHNIQUE. — Ces isolements ont été réalisés au moyen du milieu de Löwenstein glycérimé à 4 p. 100. Nous avonsensemencé les produits pathologiques directement sur le milieu lorsqu'il s'agissait de liquides comme ceux des épanchements pleuraux ou péritonéaux. Lors d'isolement à partir des ganglions mésentériques ou trachéo-bronchiques, de la rate, du foie ou du parenchyme pulmonaire, nous avons auparavant traité le liquide de broyage par l'acide sulfurique, suivant la technique de Saenz et Costil.

(\*) Communication présentée à l'Ass. Micr. L. Française, séance du 6 novembre 1941.

RÉSULTATS. — Pour chaque ensemencement, toutes les colonies sont apparues sous l'aspect lisse et dysgonique. Les premiers repiquages sur pomme de terre glycéinée ont toujours donné des cultures extrêmement discrètes. La dissociation en variantes R et S aura dans tous les cas été tardive, puisque seules nos trois plus vieilles souches, maintenant âgées de onze et de dix mois, ont donné une variante rugueuse. Les sept autres se manifestent encore sous l'aspect lisse et dysgonique des cultures initiales.

Les délais écoulés entre l'ensemencement et l'apparition des premières colonies visibles à la loupe ont été de quatorze, vingt-cinq, trente, trente-trois, trente-trois, trente-huit, trente-neuf, quarante, quarante-deux et cinquante-deux jours.

Ces résultats nous conduisent à admettre que toutes les souches que nous avons obtenues appartiennent au type bovin. Toutes, en effet, possédaient au moment de leur isolement le caractère lisse et dysgonique et se développaient mal ou pas du tout lors des premiers repiquages sur pomme de terre glycéinée ; seules les plus anciennes cultures ont présenté une variante rugueuse et eugonique.

En outre, les temps qui séparent l'ensemencement et la naissance des colonies initiales correspondent à ceux que l'on observe habituellement avec le bacille bovin (quatre semaines en moyenne), à l'exception de notre première souche qui apparut au quatorzième jour. Mais cette souche a gardé pendant huit mois, sur milieu de Löwenstein, son caractère lisse et dysgonique et c'est seulement au neuvième mois que des colonies rugueuses se sont révélées sur les cultures initiales conservées à l'étuve. Par ailleurs, cette souche — inoculée à deux reprises différentes, et séparément par M. Boquet et par nous-mêmes, chez le cobaye à la dose de 0 milligr. 01 par la voie sous-cutanée — s'est toujours comportée comme une souche très virulente, déterminant à cette dose la mort entre la quatrième et la sixième semaine avec des lésions de tuberculose généralisée. Nous n'avons pu, en raison des circonstances actuelles, effectuer l'inoculation intraveineuse de nos souches au lapin à la dose de 0 milligr. 01, qui aurait conféré à nos résultats un caractère de rigueur et démontré, sans doute possible, la nature bovine de ces germes. Toutefois, considé-



rant que tous les autres caractères sont concordants, nous nous croyons fondés à admettre avec une très grande probabilité que les 10 souches que nous avons isolées appartiennent au type bovin. Les résultats qui ont précédé nos recherches et nos résultats personnels peuvent ainsi être rassemblés et schématisés dans le tableau suivant qui met nettement en lumière la part considérable que prend le bacille bovin dans l'étiologie des tuberculoses félines :

NOM DES AUTEURS	ANNÉES de la publication	NOMBRE de souches étudiées	SOUCHES humaines	SOUCHES bovines
Galli-Valerio et Bornand. . . . .	1921	2		2
Rabinowitsch-Kempner (L.) . . . .	1921	5	3	2
	1924	5		5
Griffith (St.) . . . . .	1926	6		6
	1928	4		4
Cobbett (L.) . . . . .	1926	3		3
Paltrinieri (S.) . . . . .	1928	1		1
Bertrand (G.) . . . . .	1928	5		5
Stableforth (A. W.) . . . . .	1929	5		5
Dobson (N.) . . . . .	1930	11		11
Conti . . . . .	1932	1	1	
Liégeois (F.) et Bertrand (G.) . . .	1933	1		1
Raw (N.) . . . . .	1935	1		1
Foresti (G.) . . . . .	1936	1		1
Seren (E.) . . . . .	1936	1		1
Hjärre (A.) . . . . .	1939	7	1	6
Herlitz (C.) . . . . .	1939	3		3
Innes (J.) . . . . .	1940	8		8
Van Goidsenhoven et Schoenaers .	1940	40	1	39
Van der Hoeden . . . . .	1941	6		6
Verge (J.) et Senthille (F.) . . . .	1941	10		10
Total. . . . .		126	6	120
Pourcentage . . . . .			4,76	95,23

Il semble permis d'inférer de nos travaux que :

a) L'infection du chat se fait presque exclusivement par des produits virulents d'origine bovine : lait bacillifère et surtout poumon consommé à l'état cru. Ce viscère constitue, on le sait, la nourriture quotidienne d'un grand nombre de chats.

b) L'infection s'opère dans la règle par la voie digestive. Cette donnée se trouve confirmée par l'examen anatomo-pathologique qui révèle presque toujours un complexe primaire au niveau de l'appareil digestif ; ces lésions, souvent

observées à l'exclusion de toutes autres, traduisent dans ce cas la pénétration du germe par la voie intestinale.

c) Le chat s'infecte rarement au contact de l'homme. Cependant il semble opportun d'attirer l'attention sur le danger que le chat tuberculeux peut présenter pour les personnes de son entourage.

## BIBLIOGRAPHIE

- BERTRAND (G.). *Annales Méd. Vét.*, **73**, 1928, p. 337.  
COBBETT (L.). *Journ. Comp. Pathol. and Ther.*, **39**, 1926, p. 142.  
CONTI (R.). *La Nuova Veterinaria*, **10**, 1932, p. 85.  
DOBSON (N.). *Journal Comp. Path. and Ther.*, **43**, 1930, p. 310.  
FORESTI (C.). *La Nuova Veterinaria*, **14**, 1936, p. 321.  
GALLI-VALERIO et BORNAND. *Schweiz. Archiv f. Tierheilkunde*, **63**, 1921, p. 47.  
GRIFFITH (St.). *Vet. Journal*, **80**, 1924, p. 337 ; *J. Compar. Path. and Ther.*, **39**, 1926, p. 71 ; *Ibid.*, **41**, 1928, p. 53.  
HJERRE (A.). *Acta Tub. Scand.*, **13**, 1939, p. 103.  
HERLITZ (C.). *Acta Tub. Scand.*, **13**, 1939, p. 125.  
INNES (J.). *Vet. Journal*, **96**, 1940, p. 96.  
LIEGEOIS (F.) et BERTRAND (G.). *Ann. Méd. Vét.*, **78**, 1933, p. 216.  
PALTRINIERI (S.). *La Nuova Veterinaria*, **6**, 1928, p. 149.  
RABINOWITSCH-KEMPNER (L.). *Zeitschr. f. Tub.*, **34**, 1921, p. 570.  
RAW (N.). *Vet. Journal*, **91**, 1935, p. 149.  
SAENZ (A.) et COSTIL (C.). *Diagnostic de la tuberculose. Monographie de l'Institut Pasteur*, Paris, 1936, p. 104.  
SEREN (E.). *La Nuova Veterinaria*, **14**, 1936, p. 177.  
STABLEFORTH (A. W.). *J. Compar. Path. and Ther.*, **42**, 1929, p. 163.  
VAN GOIDSENHOVEN et SCHOENAERS. *Ann. Méd. Vét.*, **85**, 1940-1941, p. 1.  
VAN DER HOEDEN. *Tijdschrift v. Dierg.*, **68**, 1941, p. 335.

## VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ PATHOGÈNE DU *TREPONEMA PALLIDUM* D'ORIGINE HUMAINE

par C. LEVADITI.

(Institut Alfred-Fournier.)

Dans une communication présentée à la séance du 13 mai 1937 de la Société française de Dermatologie et de Syphiligraphie, concernant les « variations de l'activité pathogène du *Treponema pallidum* », C. Levaditi, A. Vaisman et R. Schoen (1) concluaient comme suit :

« Il est hors conteste que malgré la même provenance syphilitomateuse humaine, le *Treponema pallidum* ne se comporte pas identiquement du point de vue de ses propriétés biologiques, et, en particulier, de sa virulence pour les espèces animales réceptives. Son potentiel chancrigène pour le lapin, de même que sa capacité dispersive chez la souris, varient sensiblement. Il se peut, d'ailleurs, qu'il en soit de même de ses affinités neurotropes. Or, ce comportement est appelé à expliquer bien des points restés encore obscurs, concernant la pathogénie de la syphilis et de la neuro-syphilis, l'allergie et l'anallergie syphilitique, la résistance aux médicaments, etc. »

Étaient invoqués à l'appui de ces conclusions toute une série d'essais réalisés avec quatre souches tréponémiques humaines, dont on avait étudié la chancrigénèse chez le lapin et le chimpanzé, de même que l'aptitude à engendrer, chez la souris, la syphilis cliniquement inapparente [présence de tréponèmes dans les ganglions lymphatiques périphériques, l'utérus, les ovaires (méthode de Diéterlé)], et aussi leur dispersion dans l'ensemble du revêtement cutané [méthode de

(1) LEVADITI, VAISMAN et SCHOEN. *Bull. Soc. franç. Dermat. et Syph.*, 44, 1936, p. 789 ; Cf. également ces *Annales*, 56, 1936, p. 251.



Stroesco (2)]. *C'est pour la première fois que la souris fut utilisée pour l'étude microbiologique de la virulence du matériel syphilitique humain.*

Or, par suite des événements que l'on connaît, nous avons été contraints d'interrompre les passages des souches adaptées, conservées depuis de longues années dans nos services de l'Institut Pasteur et de l'Institut Alfred-Fournier (souches Gand et Truffi). De ce fait, nous avons été obligés de pratiquer de nouvelles inoculations de virus syphilitique d'origine humaine à des animaux réceptifs, et, tout particulièrement, à la souris, espèce plus facile à se procurer à l'heure actuelle. Les recherches qui font l'objet du présent mémoire ont été commencées le 3 septembre 1940. Dès le début, nous avons prévu qu'elles aboutiraient à des résultats qui, comparés à ceux relatés en 1937, ne manqueraient pas d'offrir quelque intérêt, surtout en ce qui concerne la variabilité des propriétés biologiques du *Treponema pallidum*.

Si l'étude du potentiel chancrigène pour le lapin n'offrait aucune difficulté, puisqu'il s'agissait, en somme, de préciser si telle souche tréponémique était plus apte qu'une autre à provoquer le syphilome scrotal, ou la kératite spécifique, par contre le problème de la capacité dispersive du spirochète chez la souris nous est apparu plus compliqué. En effet, dans ce cas particulier, en l'absence de tout signe clinique permettant d'affirmer si l'animal a contracté ou non la tréponémose, on était obligé de le sacrifier afin d'entreprendre l'examen microscopique (imprégnation argentique) de ses divers systèmes tissulaires. Or, il était à prévoir qu'étant donné les difficultés de l'adaptation des souches humaines à la souris, la période d'incubation serait de longue durée, et, en général, variable non seulement d'après l'activité pathogène de la souche, mais encore suivant la réceptivité de l'animal. On risquait ainsi de sacrifier la souris en deçà de l'accomplissement de cette période d'incubation, donc avant la phase dispersive proprement dite, et de conclure ainsi à

(2) STROESCO et VAISMAN. *Bull. Acad. Méd.*, **115**, 1936, p. 657 ; *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 399 ; *Ces Annales*, **53**, 1937, p. 403. — LEVADITI, VAISMAN et ROUSSET-CHABAUD. *Bull. Acad. Méd.*, **123**, 1940, p. 762 ; *ibid*, p. 984.

un résultat négatif, alors qu'en réalité il n'en était rien. Au surplus, il apparaissait désirable de découvrir une méthode qui permit de suivre, pour ainsi dire, pas à pas l'évolution de la pullulation spirochétienne chez la *souris vivante*, afin de mieux comparer entre elles les diverses souches humaines.

Ce furent là les principales raisons pour lesquelles, dès le 12 décembre 1940, et après maintes tentatives, nous avons fixé les détails d'une telle méthode, en pratiquant des *biopsies* de la peau du dos, biopsies examinées grâce à la technique d'imprégnation argentique que Stroesco avait, dès 1936, mise au point dans notre service à l'Institut Alfred-Fournier. Dès nos premiers essais, nous avons apprécié l'exactitude et l'utilité pratique de cette méthode qui, en moins de trois jours, permet de faire le diagnostic microbiologique de la syphilis cliniquement inapparente, sans que pour cela il soit nécessaire de sacrifier l'animal. Nous avons relaté nos premiers résultats dans une communication faite en collaboration avec A. Vaisman et D. Rousset-Chabaud, à la séance du 11 février 1941 de l'Académie de Médecine (3).

\*  
\* \*

Les recherches qui font l'objet du présent travail ont été réalisées avec 7 souches tréponémiques humaines, que nous devons à nos collègues P. Chevalier (3 cas), Milian (1 cas) et Touraine (3 cas). Nous les prions d'agréer l'expression de nos plus vifs remerciements.

En voici les principaux détails :

TECHNIQUE. — Du suc de chancre syphilitique contenant de nombreux tréponèmes (5 cas), ou des fragments de plaques muqueuses (2 cas), sont inoculés, soit par injection, soit par greffe, d'une part sous le scrotum et à la cornée du lapin, d'autre part, sous la peau du dos de plusieurs souris blanches. Dans le premier cas, on suit l'évolution du chancre scrotal et de la kératite et on en vérifie la nature tréponémique. Dans le second, on pratique des biopsies du revêtement cutané dorsal (4) à des intervalles divers (voir ci-dessous), et on y recherche

(3) C. LEVADITI, A. VAISMAN et D. ROUSSET-CHABAUD. *Bull. Acad. Méd.*, **124**, 1941, p. 176.

(4) La plaie, dont les bords sont rapprochés par des agrafes, se cicatrise rapidement, ce qui permet d'effectuer des biopsies en série.

les spirochètes en se servant de la technique d'imprégnation argentique de Stroesco. Puis, après un laps de temps variable [en général assez long (5)], on sacrifie l'animal et on étudie la *dispersion généralisée* des parasites dans la peau du dos, du ventre, des narines et du crâne, et aussi dans le rectum, le périnée et les ganglions lymphatiques périphériques. En outre, des passages sont réalisés, soit sur le lapin, soit sur la souris (6).

## Résultats.

Les résultats enregistrés sont représentés dans les schémas

### Indications graphiques.

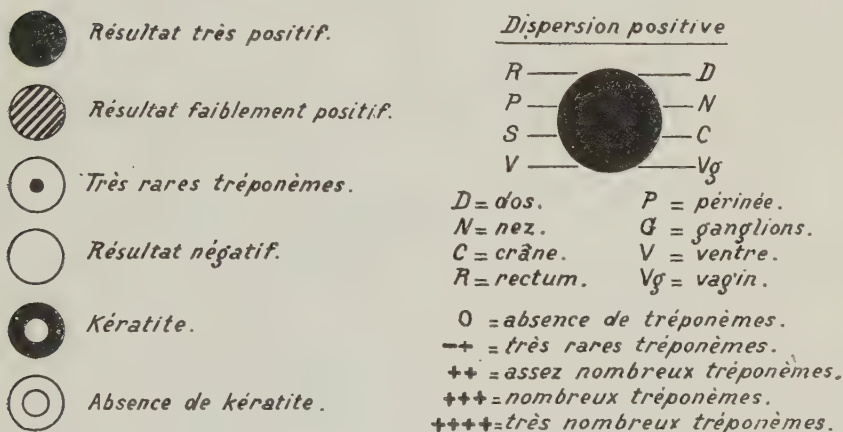


FIG. 1.

qui accompagnent le présent travail ; on trouvera la signification des annotations dans la figure 1.

### I. — Inoculation aux lapins (Cf. schémas 1 à 5).

L'inoculation au lapin, par voie sous-scrotale ou cornéenne, de 5 de nos souches (n° I, II, V, VI et VII) a été couronnée de

(5) Ce temps est indiqué dans les schémas ci-contre.

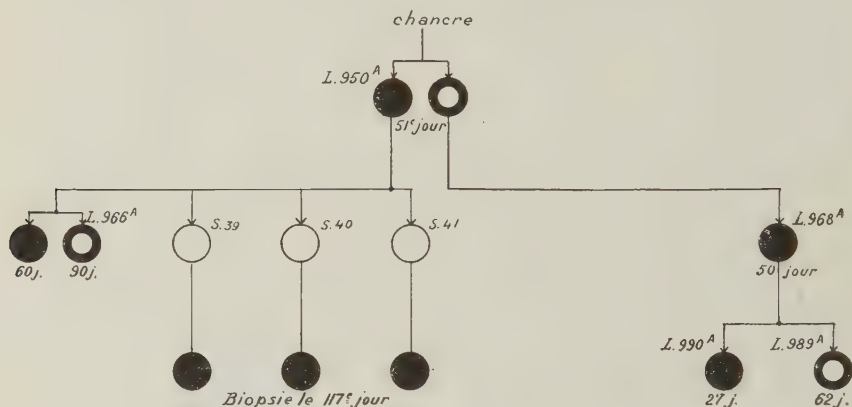
(6) Ni l'examen des poils arrachés sur le dos (point d'inoculation), ou autour des narines (imprégnation argentique), ni celui du liquide accumulé dans des tubes capillaires insérés sous la peau de la région dorsale, ne nous ont fourni des résultats satisfaisants.



succès quatre fois (80 p. 100). Des syphilomes spirochéliens

Souche humaine N°1 (Pouv...)

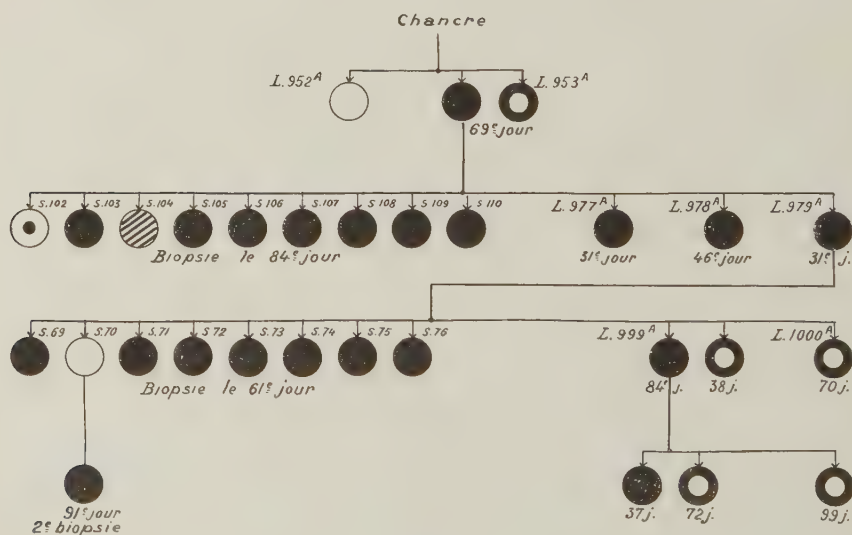
Inoculation au lapin



SCHEMA 1.

Souche humaine N°2 (Hub)

Inoculation au lapin



SCHEMA 2.

sont apparus du quarantième au soixante-neuvième jour, et des kératites entre le quarante-septième et le soixante-neuvième

jour. Des passages sur d'autres lapins furent réalisables (sou-

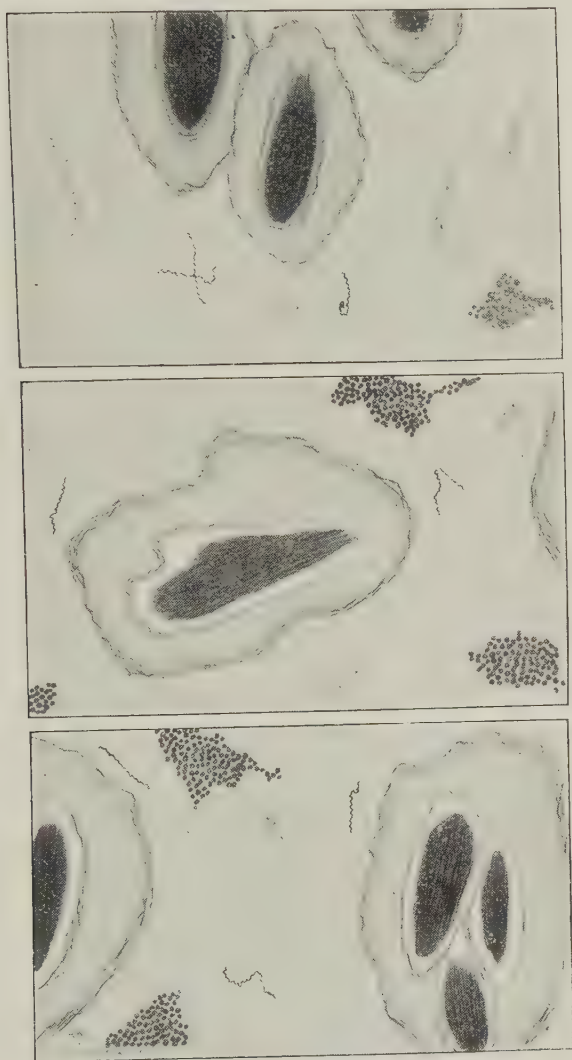


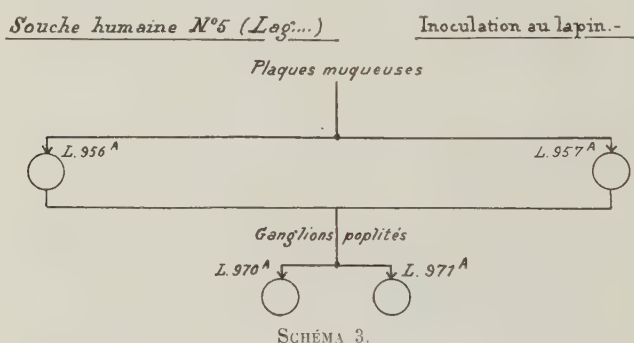
FIG. 2. — Tréponèmes dans trois biopsies de souris. Méthode de Stroesco.  
Gross. : 4.000/1.

ches I, II, VI et VII), en sorte que, pour ce qui a trait au potentiel chancrigène ou kératogène pour le lapin, aucune diffé-

rence bien nette n'a été révélée entre les diverses souches tréponémiques examinées [excepté pour une de ces souches (n° V) où, pour des raisons d'infection secondaire locale, il n'y eut pas d'éclosions de chancre scrotal].

## II. — Inoculation à la souris (Cf. schémas 6 à 12 et fig. 2).

Les résultats de l'inoculation à la souris sont manifestement différents des précédents. Nous examinerons, tour à tour, les



données fournies par la méthode des biopsies et celles enregistrées grâce à l'étude de la dispersion spirochétienne dans l'ensemble de l'organisme.

### 1° BIOPSIES.

Le nombre des biopsies pratiquées chez les souris primo-inoculées a été de 35, celui des divers passages de nos souches de 78, ce qui fournit un total de 113. Dans ce qui suit, nous envisagerons les résultats, d'une part, suivant les souches prises en considération, d'autre part, d'après l'échelonnement de ces biopsies dans ce temps.

a) RÉSULTATS DES BIOPSIES D'APRÈS LA SOUCHE TRÉPONÉMIQUE PRISE EN CONSIDÉRATION (Cf. tableau I et schémas 6 à 12).

Il résulte des données résumées dans le tableau I que, pour ce qui a trait à la pullulation du tréponème au point d'inocu-

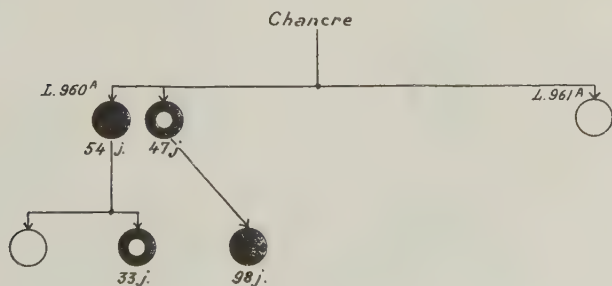
TABLEAU 1.

SOUCHES	BIOPSIES	NOMBRE d'animaux	DATE de la biopsie en jours	RÉSULTATS				
				positifs	négatifs	rapport entre + et 0	positifs p. 100 (1)	négatifs p. 100
I	1 <sup>er</sup>	5	101 à 161	0	5	1/8	11	89
	2 <sup>e</sup>	4	181 à 201	1	3			
	Total . .	9		1	8			
II	1 <sup>er</sup>	4	101 à 161	3	1	4/0	80	20
	2 <sup>e</sup>	1	147	1	0			
	Total . .	5		4	1			
III	1 <sup>er</sup>	3	83 à 116	2	1	3/1	75	25
	2 <sup>e</sup>	1	141	1	0			
	Total . .	4		3	1			
IV	1 <sup>er</sup>	2	92	0	2	1/4	20	80
	2 <sup>e</sup>	2	151	1	1			
	3 <sup>e</sup>	1	192	0	1			
	Total . .	5		1	4			
V	1 <sup>er</sup>	2	92	2	0	2/0	100	0
VI	1 <sup>er</sup>	4	79 à 124	4	0	4/0	100	0
VII	1 <sup>er</sup>	4	92 à 124	3	1	5/1	81	19
	2 <sup>e</sup>	2	124 à 176	2	0			
	Total . .	6		5	1			

(1) L'expression des résultats positifs et négatifs en pourcentage est, de toute évidence, critiquable, étant donné le nombre restreint des animaux inoculés avec chacune de nos souches. Nous nous en servons, cependant, afin de faciliter la comparaison entre ces souches.

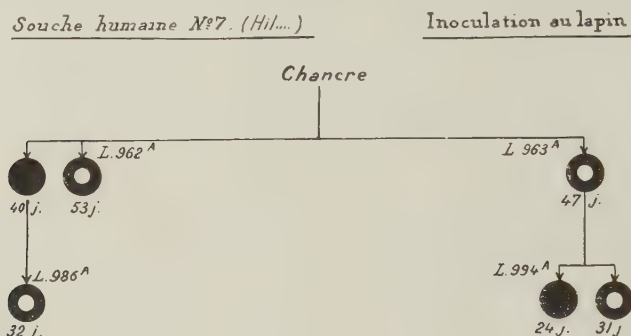
*Souche humaine N° 6 (Sp....)*

*Inoculation au lapin*

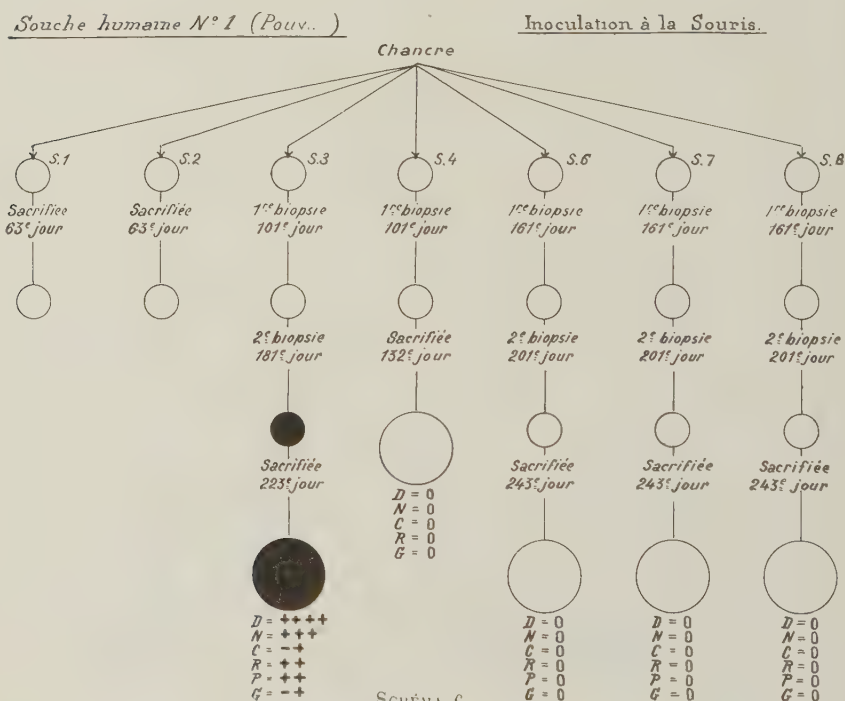




lution (revêtement cutané du dos), révélée par la biopsie, des différences notables apparaissent entre les diverses souches



SCHEMA 5.

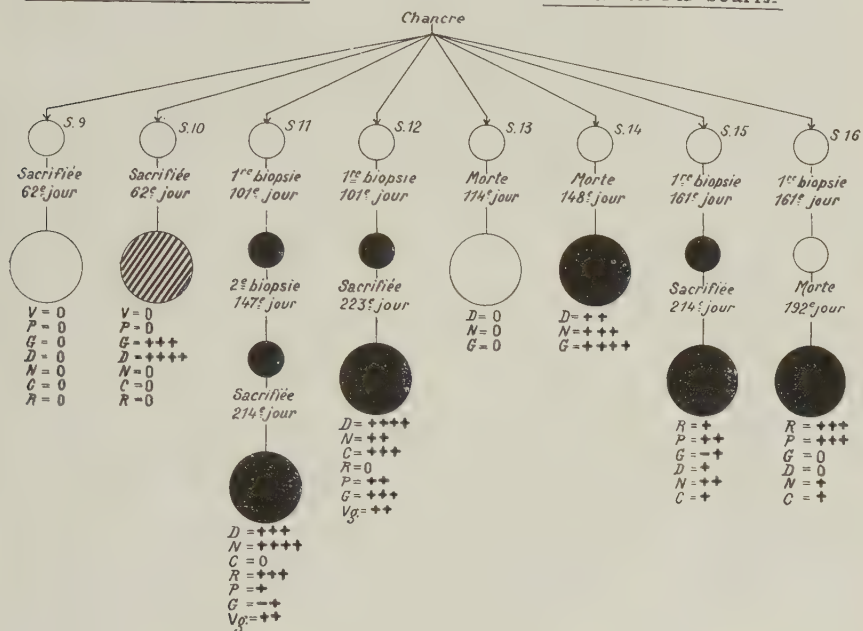


SCHEMA 6.

humaines examinées. En effet, le pourcentage des résultats positifs fut de 44 et 20 pour les souches I et IV, et de 75, 80, 84 et 100 pour les autres souches. Ceci montre que *le potentiel*

Souche humaine N°2 (Hub...)

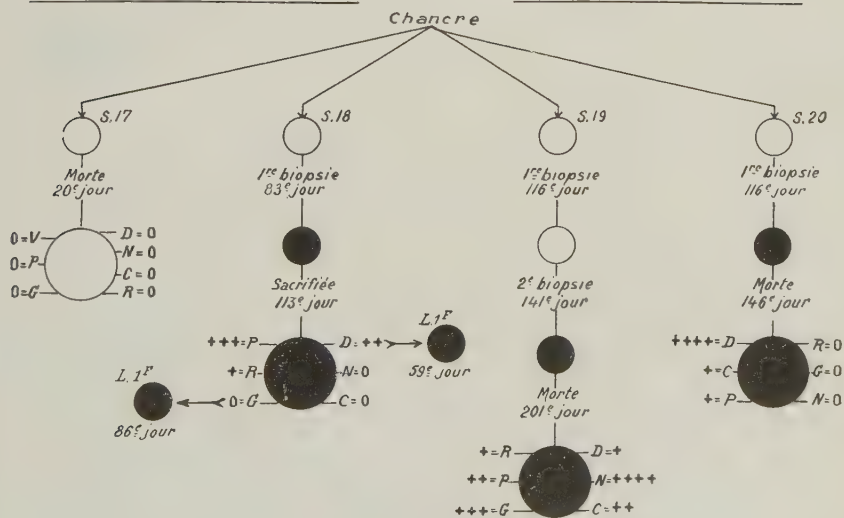
Inoculation à la Souris.



SCHEMA 7.

Souche humaine N°3 (Len...)

Inoculation à la Souris.



SCHEMA 8.

*prolifératif in situ des tréponèmes chez la souris est loin d'être le même, et qu'il y a lieu de faire une discrimination entre les souches I et IV, à pullulation locale nulle, extrêmement faible ou retardée, d'une part, et les souches II, III, VI et VII à potentiel germinatif particulièrement accusé, d'autre part.*

Ajoutons que les biopsies positives les plus précoces ont été effectuées entre le soixante-dix-neuvième et le quatre-vingt-onzième jour.

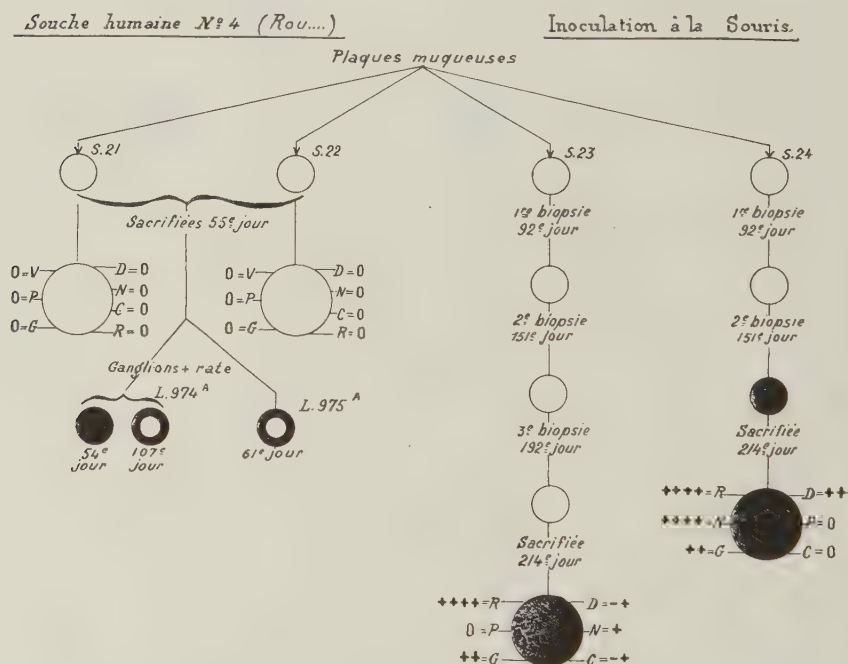


SCHÉMA 9.

b) RÉSULTATS DES BIOPSIES SUIVANT LEUR ÉCHELONNEMENT DANS LE TEMPS (alternance des données négatives et positives). — Nous indiquons ci-dessous la fréquence des résultats positifs et négatifs des diverses biopsies effectuées chez le même animal, dans l'ordre chronologique des prélèvements.

- (1) Première biopsie : positive. 13 animaux (souches I, III, V, VI et VII).
- (2) Première biopsie : négative. } 5 animaux (souches I, III et VII).
- Deuxième biopsie : positive. }
- (3) Trois biopsies successives : négatives. 1 animal (souche IV).

Nous en concluons que dans la majorité des cas (68 p. 100), la pullulation tréponémique locale a pu être révélée dès la première biopsie. Dans 5 cas (26 p. 100), cette indication n'a été fournie que par la seconde biopsie. Enfin, dans un seul cas (6 p. 100) toutes les trois biopsies furent négatives (et cela chez

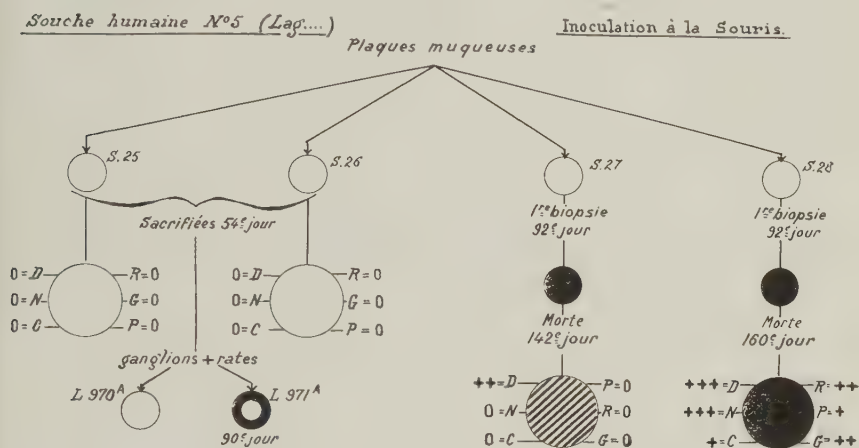


SCHÉMA 10.

un sujet où la dispersion généralisée fut, cependant, constatée ultérieurement).

Ceci met en lumière la valeur diagnostique incontestable de la méthode des biopsies.

## 2° LA DISPERSION

DU *Treponema pallidum* DANS L'ENSEMBLE DE L'ORGANISME (Cf. tableau II et schémas 6 à 12).

Vingt-quatre examens de souris primo-inoculées ont été effectués du point de vue de la dispersion des tréponèmes dans le revêtement cutané du dos, du ventre, du crâne et des narines, et aussi dans le rectum (musculature lisse), le périnée et les ganglions lymphatiques périphériques, et cela soit chez des animaux ayant succombé en cours d'expérience, soit chez des sujets sacrifiés tardivement. Le tableau II, ainsi que les schémas ci-contre résument les résultats enregistrés (à comparer avec ceux fournis par l'examen des biopsies).



TABLEAU II.

SOUCHE	NOMBRE d'examen	NOMBRE de résultats positifs	RÉSULTATS POSITIFS		
			Dispersions		Biopsies p. 100
			Rapport	p. 100	
I. . . . .	5	1	1/5	20	11
II. . . . .	4	4	4/4	100	80
III. . . . .	3	3	3/3	100	75
IV. . . . .	2	2	2/2	100	20
V. . . . .	2	2	2/2	100	100
VI. . . . .	4	4	4/4	100	100
VII. . . . .	4	4	4/4	100	81

Du tableau II, ainsi que des schémas, il ressort que si l'on tient compte de la fréquence des résultats positifs fournis par l'étude de la dispersion, un écart manifeste sépare la

Souche humaine N° 6 (Sp....)

Inoculation à la Souris.

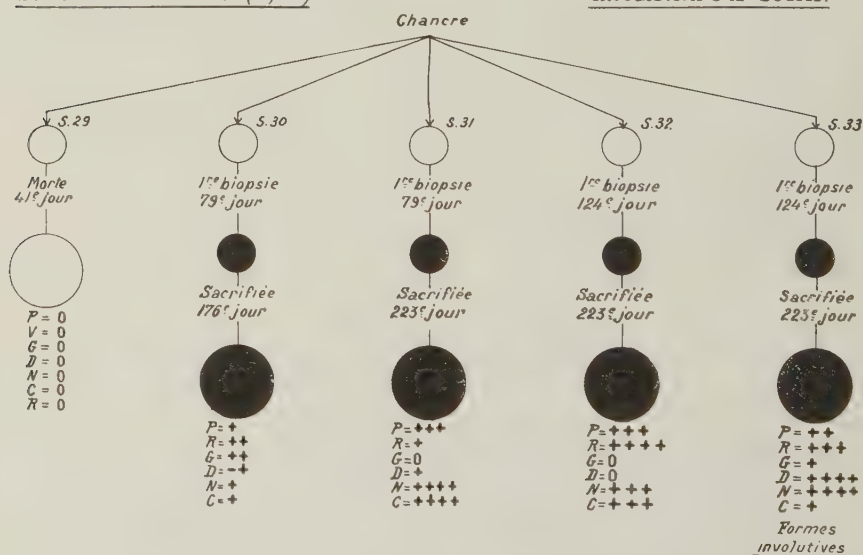


SCHÉMA 11.

souche I des autres souches étudiées, en ce sens qu'une seule parmi les 5 souris en expérience a montré une telle dispersion généralisée, tandis que chez les animaux contaminés

avec les souches II à VII, la présence du *Treponema pallidum* dans le divers système tissulaire fut révélée constamment. Cette constatation est conforme à celle qui découle des examens des biopsies. Toutefois, il apparaît que cette dernière méthode (peu importe s'il s'agit d'excisions uniques ou répétées) est légèrement moins fidèle que la première. En effet, dans 4 des 7 souches examinées, le pourcentage des résultats positifs fournis par la biopsie a été tant soit peu inférieur à celui obtenu après étude de la dispersion. Rien d'étonnant à cela, pour la simple raison que cette dispersion est recherchée dans sept ou huit secteurs différents de l'organisme, alors que la biopsie n'intéresse qu'un tout petit fragment de la peau du dos. Quoi qu'il en soit, et malgré ces différences en défaveur de la méthode des biopsies, cette méthode garde toute sa valeur indicative.

### 3° CLASSEMENT DES DIVERSES SOUCHES TRÉPONÉMIQUES D'ORIGINE HUMAINE SUIVANT LEUR CAPACITÉ DISPERSIVE.

Si l'on envisage l'ensemble des constatations relatées ci-dessus, on peut classer comme suit les sept souches humaines étudiées, suivant leur aptitude dispersive chez la souris blanche, en d'autres termes, suivant leur *potentiel d'adaptation à l'organisme de cette espèce animale*.

I. SOUCHE DIFFICILEMENT ADAPTABLE. — Souche I (v. schéma 6). Sept inoculations. Deux animaux sacrifiés le soixante-troisième jour [donc à une période relativement précoce de l'infection (7)] et 5 sacrifiés entre le cent trente-deuxième et le deux cent unième jour. Résultats positifs : 11 p. 100.

II. SOUCHE DONT L'ADAPTATION EST LENTE A SE PRODUIRE. — Souche IV. Deux inoculations ; les animaux sont sacrifiés le deux cent quatorzième jour. Deux résultats positifs. Toutefois, chez la souris 23, trois biopsies effectuées les quatre-vingt-

(7) Il a été démontré antérieurement que si l'on se sert d'une souche parfaitement adaptée (souche Gand, par exemple), la dispersion est manifeste dès le trentième ou le quarantième jour.

douzième, cent cinquante et unième et cent quatre-vingt-douzième jours, se sont révélées négatives, et on n'a réussi à déceler la tréponémose que lorsque cette souris fut sacrifiée le deux cent quatorzième jour (peau du dos, des narines et du crâne, rectum et ganglions lymphatiques périphériques) [Cf. schéma 9].

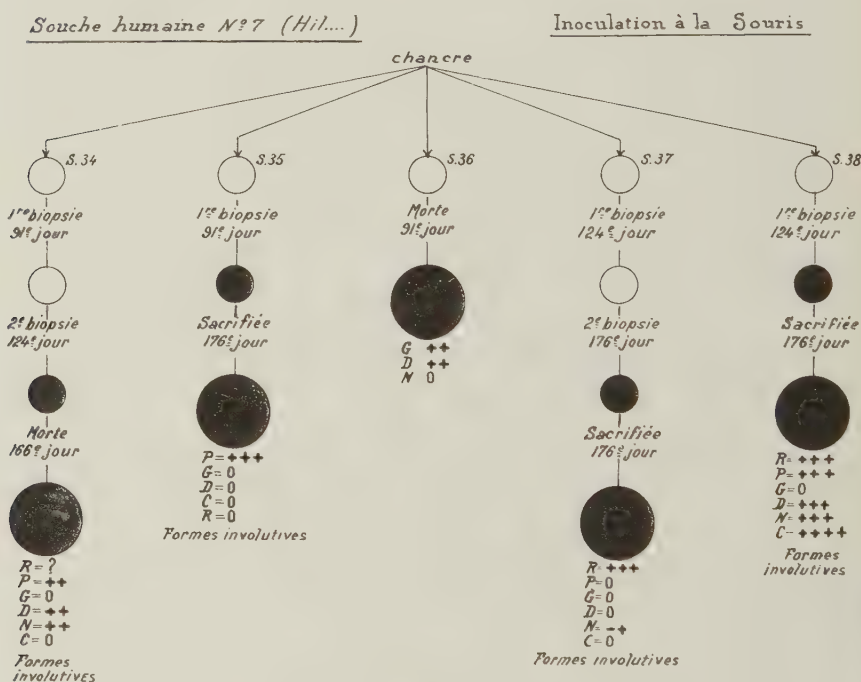


SCHÉMA 12.

III. SOUCHES TRÈS ADAPTABLES. — a) *Souche n° II* : 8 inoculations. Deux souris sacrifiées le soixante-deuxième jour, les 6 autres entre cent quatorze et deux cent vingt-trois jours. *Résultats positifs* : 75 p. 100 (Cf. schéma 7) ; b) *souche n° III* : 4 inoculations (dont une sans valeur, l'animal ayant succombé le vingtième jour). Trois souris mortes ou sacrifiées entre cent treize et cent quarante-six jours. *Résultats positifs* : 100 p. 100 (Cf. schéma 8) ; c) *souche n° VI* : 5 inoculations. Une souris morte le quarante et unième jour (donc trop tôt), les 4 autres sacrifiées de cent soixante-seize à deux

cent vingt-trois jours. *Résultats positifs* : 100 p. 100 (Cf. schéma 11) ; d) souche n° VII : 5 inoculations. Une souris morte le quatre-vingt-onzième jour, les 4 autres sacrifiées de cent soixante-six à cent soixante-seize jours. *Résultats positifs* : 100 p. 100 (Cf. schéma 12).

Donc, trois nuances : *souches humaines s'adaptant facilement à l'organisme de la souris, souches adaptables, mais tardivement, et, enfin, souches difficilement adaptables, telles sont les conclusions qui découlent de ces essais concernant le potentiel d'adaptation, considéré sur le plan de la capacité dispersive du Treponema pallidum.*

*Ce sont là, de toute évidence, des caractères biologiques démontrant la variabilité des diverses souches spirochéliennes isolées directement de l'homme par inoculation à la souris blanche. Mais il y a plus :*

a) FRÉQUENCE DES FORMES INVOLUTIVES DU TRÉPONÈME. — Nous avons signalé à deux reprises (8) la présence de formes involutives du tréponème (fig. 3) chez certaines souris atteintes de syphilis expérimentale cliniquement inapparente, et apporté la preuve qu'il ne s'agit pas là d'un phénomène local, lié à l'état particulier de tel ou tel système tissulaire contaminé, mais d'un processus général intéressant l'ensemble de l'organisme. Or, chez les souris primo-inoculées avec une de nos souches (la septième), nous avons été frappé par la fréquence insolite de ces formes involutives. Elles furent, en effet, décelées chez 4 des 5 animaux en expérience, morts ou sacrifiés entre cent soixante-six et cent soixante-seize jours. Elles étaient particulièrement nombreuses simultanément dans la peau du dos, des narines et du crâne, et aussi dans le rectum (musculaire lisse) et le périnée. Fait particulièrement intéressant : de tels aspects involutifs n'ont été observés que chez une seule souris parmi les 33 inoculées avec nos autres souches humaines. *Il semble donc bien que certains tréponèmes sont plus aptes que d'autres à subir, chez la souris, des trans-*

(8) C. LEVADITI, VAISMAN et ROUSSET-CHABAUD. *Bull. Acad. Méd.*, **123**, 1940, p. 762. — C. LEVADITI et VAISMAN. *C. R. Soc. Biol.*, **135**, 1941, p. 467 et 1105.



*formations involutives pouvant aboutir à la formation de « granules argentophiles », granules dont la signification reste dubitative en l'état actuel de nos connaissances.*

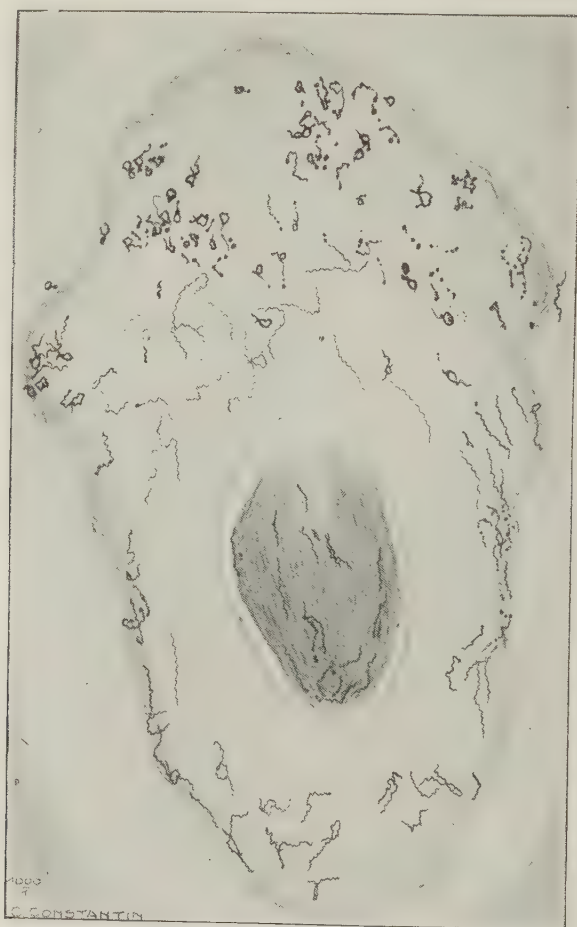


FIG. 3. — Coupe de la peau d'une souris. Phases involutives des tréponèmes (bulbe pileux). Souche Gand. Méthode de Stroesco. Gross. : 4.000/1.

b) PRÉSENCE DU SPIROCHÈTE DANS LES GANGLIONS LYMPHATIQUES PÉRIPHÉRIQUES. — La même différence apparaît si l'on considère la fréquence des constatations positives concernant la présence du spirochète dans les *ganglions lymphatiques péri-*

*phériques* (imprégnation des coupes par la méthode de Stroesco). En fait, chez les animaux inoculés avec la souche spirochétienne n° II, l'incidence des résultats positifs a atteint 60 p. 100, alors qu'avec la souche n° VII, tout aussi dispersive que la précédente, cette incidence n'a pas dépassé 20 p. 100. Faut-il rapprocher cette faible parasitose intraganglionnaire du fait qu'il s'agit, précisément, d'une souche à tendances involutives très accusées ? Nous ne saurions nous prononcer à ce sujet.

Ajoutons qu'à plusieurs reprises nous avons constaté que les ganglions lymphatiques périphériques et la rate, apparemment dépourvus de tréponèmes décelables sur coupes imprégnées à l'argent, pouvaient se révéler virulents après inoculations à des animaux réceptifs (souches IV et VI).

### Conclusions générales.

*Sept souches tréponémiques humaines ont été examinées du point de vue de leur potentiel morbigène pour le lapin et la souris, et aussi en ce qui concerne leur capacité dispersive chez cette dernière espèce animale. Au cours de ces recherches, la valeur diagnostique de la méthode des biopsies, appliquée à l'étude de l'évolution de la syphilis cliniquement inapparente, nous est apparue hors conteste. Ainsi, nos investigations actuelles, réalisées par des procédés plus nouveaux et perfectionnés, confirment, dans leurs grandes lignes, les conclusions formulées antérieurement par Levaditi, Vaisman et Schoen, à savoir que parmi les souches de Treponema pallidum isolées directement de l'homme, il y en a qui sont biologiquement équivalentes, et d'autres qui s'en écartent manifestement, surtout si on les considère du point de vue de leur potentiel dispersif pour l'organisme de la souris.*

Dès lors, il nous apparaît nécessaire de poursuivre ces recherches afin de préciser :

1° L'influence du nombre des spirochètes inoculés sur leur potentiel dispersif (ajouter la notion de quantité à la notion de qualité) ;

2° Des différences analogues à celles relatées au cours de ce travail apparaîtraient-elles si l'on examinait la même souche tréponémique au cours des différentes phases évolutives de la syphilis humaine, soumise ou non au traitement spécifique ?

**ADAPTATION DIRECTE AU POUMON DE SOURIS  
D'UNE SOUCHE DE TYPHUS HISTORIQUE ISOLÉE  
ET CONSERVÉE SUR COBAYE  
COMPORTEMENT DES RICKETTSIES  
AU COURS DE CETTE EXPÉRIMENTATION**

par PAUL GIROUD et RENÉ PANTHIER.

La culture des Rickettsies du typhus exanthématique dans le poumon a été un très important progrès technique, car cet organe permet la production de grandes quantités de suspensions vaccinales. Ruiz Castaneda (1) a utilisé le premier le poumon de souris, de lapin, de mouton avec une souche mexicaine qui provoquait la réaction scrotale du cobaye. Elle avait été isolée du sang d'un malade de l'hôpital de Mexico et avait subi à ce moment 150 passages. Elle était et restait donc « orchitique ».

Indépendamment de lui, Paul Durand et Hélène Sparrow (2) ont infecté aux dépens d'intestins de poux, inoculés par voie rectale avec une souche de typhus historique, ne provoquant donc pas l'orchite, le poumon de souris et de divers rongeurs, y compris le lapin.

La réaction orchitique manque avec les virus épidémiques de l'ancien monde (3) et cependant nous désirions pouvoir adapter directement au poumon une souche de typhus historique classique conservée ou isolée sur cobaye (4). Une souche entretenue par passages très fréquents (toutes les quarante-huit heures) peut en effet être perdue ou contaminée. Son

(1) Ruiz CASTANEDA. *Medecina*, **18**, 1938, p. 607 ; *Am. J. Path.*, **15**, 1939, p. 467.

(2) Paul DURAND et Hélène SPARROW. *C. R. Ac. Sc.*, **210**, 1940, p. 420 ; *Arch. Inst. Pasteur*, Tunis, **29**, 1940, p. 1.

(3) Il nous a cependant été possible d'observer des réactions scrotales tout particulièrement importantes sur le cobaye inoculé avec le sang de malades infectés de typhus historique européen. Cette réaction scrotale n'a existé qu'au premier passage (non publié).

(4) P. GIROUD et R. PANTHIER. *C. R. Ac. Sc.*, **212**, 1941, p. 61.



pouvoir antigène peut aussi se modifier pendant les passages, accident qui survient par exemple pour la technique de Zinsser au cours des repiquages continus sur gélose-tissus. Il nous importait enfin de pouvoir incorporer facilement des souches nouvelles pour l'obtention d'antigènes vaccinaux divers. En écartant toute manipulation du pou, manipulation qui nécessite un personnel très spécialisé pour leur élevage et les inoculations anales, on simplifiait donc et rendait pratique cette opération.

Nos premiers essais positifs, sans passage par l'hôte invertébré, furent faits avec des lésions pulmonaires d'animaux infectés par voie péritonéale. Nous avons prélevé des fragments de poumon de cynocéphale inoculé avec une souche de passage et de cobayes inoculés avec une souche à l'isolement. Ces fragments broyés et injectés ou traités par centrifugation fractionnée et inoculés ensuite à la souris par voie nasale, avaient provoqué l'hépatisation pulmonaire de cet animal avec présence de rickettsies (5).

Mais nos essais les plus nombreux ont été faits avec l'exsudat vaginal de cobayes infectés de typhus historique. Cet exsudat nous avait déjà servi à adapter, aussi bien à la souris qu'au lapin, une souche de fièvre pourprée (6) [souche Parker] et une souche de fièvre boutonneuse (souche Juan) conservée à Paris, mais ces virus donnent habituellement et classiquement une réaction scrotale. Il n'en est pas de même avec le virus historique. Ce sont ces essais d'adaptation à la souris dont nous allons d'abord parler.

#### ESSAIS FAITS AUX DÉPENS DE LA VAGINALE DU COBAYE.

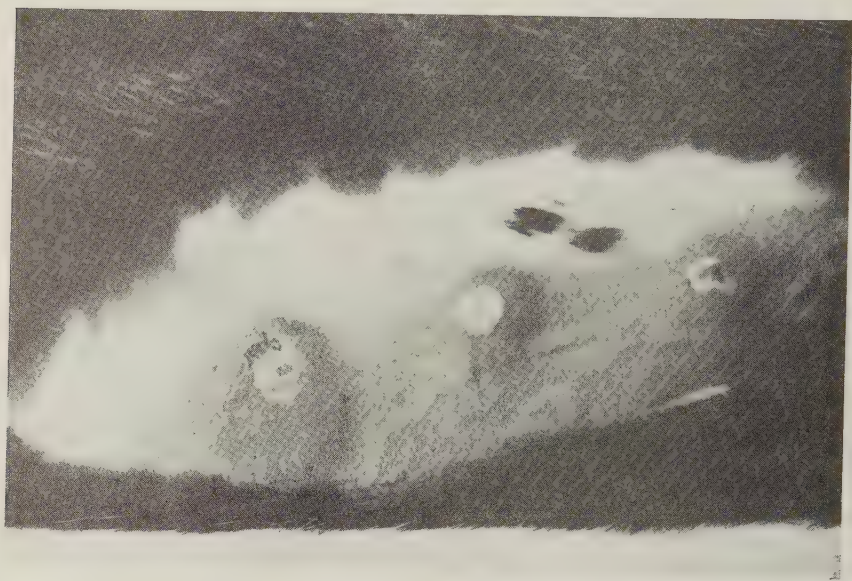
L'évolution de la souche de typhus historique qui nous a servi (souche Tunis Rabta de Ch. Nicolle) est bien connue des

(5) Nous avons pu aussi infecter le poumon aux dépens du pou broyé, nourri sur des individus infectés et avec des cultures en œuf de poule fécondé.

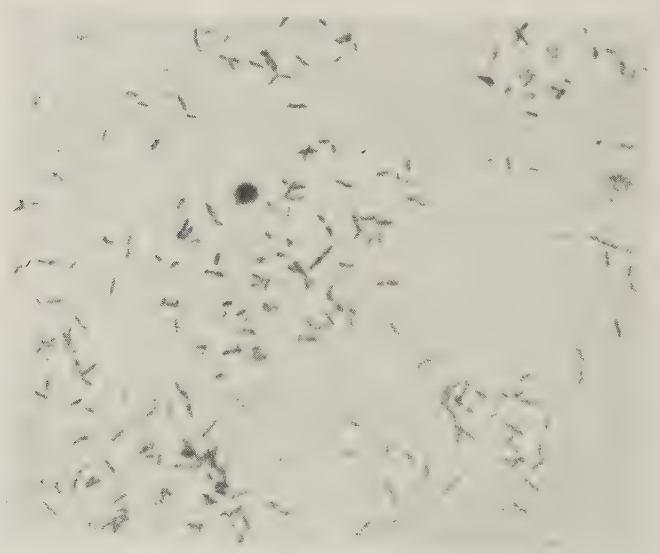
(6) Une partie de ces expériences seulement a été publiée avec Paul DURAND et Hélène SPARROW. — Paul DURAND, Paul GIROUD et Hélène SPARROW. *C. R. Ac. Sc.*, **210**, 1940, p. 751 ; *Arch. Inst. Pasteur*, Tunis, **29**, 1940 — Paul GIROUD et Paul DURAND. *C. R. Ac. Sc.*, **210**, 1940, p. 753 ; **211**, 1940, p. 167 ; *Arch. Inst. Pasteur*, Tunis, **29**, 1940.



PLANCHE I.

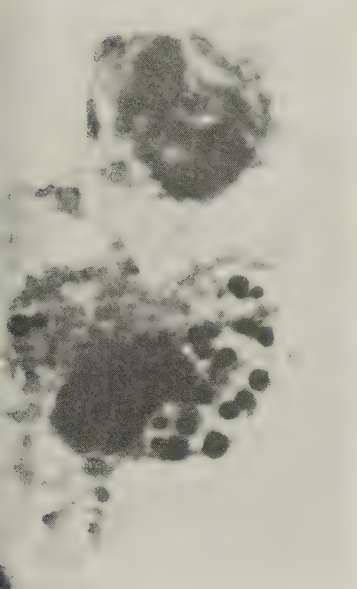


Dosage de la virulence dans la peau du lapin. (Photo P. Jeantet.)

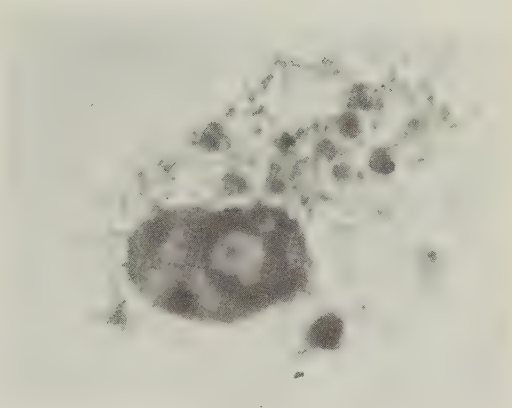


Frottis de poumon de souris (virus historique venant directement du cobaye et au 3<sup>e</sup> passage sur souris). Gross. :  $\times 2.100$ . (Photo P. Jeantet.)

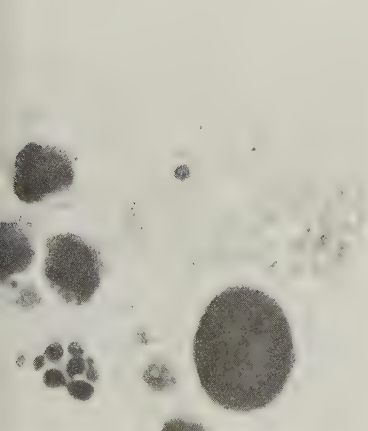
PLANCHE II.



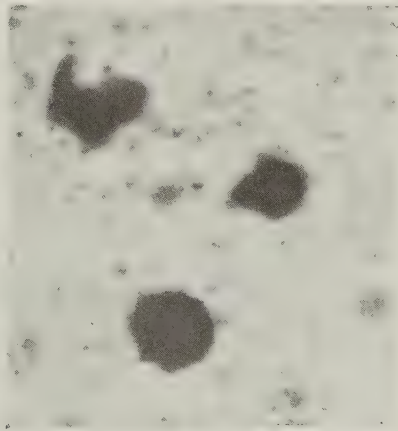
Corps homogènes rouges rubis.  
Gross. :  $\times 2.100$ . (Photo P. Jeantet.)



Enclaves roses, virus historique au cours de sa  
réadaptation. Gross. :  $\times 2.100$ . (Photo P. Jeantet.)



Corps non homogènes ou granuleux rouges.  
Gross. :  $\times 2.100$  (Photo P. Jeantet.)



Corps punctiformes rouge rubis et bleus.  
Gross. :  $\times 2.100$ . (Photo P. Jeantet.)





laboratoires qui s'occupent du typhus. Voici son évolution classique chez le cobaye inoculé dans le péritoine avec une suspension de cerveau. Après une incubation de sept à huit jours, on observe chez l'animal mâle une hyperthermie et un léger exsudat au niveau des vaginales. Cet exsudat contient rarement des rickettsies.

Exceptionnellement on peut noter une évolution particulière. La période d'incubation est alors raccourcie et il existe une péri-orchite. Les vaginales très congestionnées sont recouvertes d'un exsudat abondant. Ces variations spontanées sont saisonnières et peuvent aussi être en rapport avec les régimes (7). Le mode de conservation de la souche joue également un rôle dans leur apparition (8).

Artificiellement enfin, on peut augmenter l'exsudat vaginal et provoquer la présence des rickettsies par des injections intra-péritonéales répétées de divers produits. Mooser, Varela et Pilz (9) ont obtenu ce résultat par des injections de sang. Nous avons pu provoquer la présence de rickettsies par l'injection répétée d'extrait orchitique, d'extrait globulaire (10) ou même d'antigène toxique (suspension bactérienne chauffée, typhique ou paratyphique par exemple). Nous insistons sur les variations du comportement du virus historique sur cobaye car nos essais se rapportent à ces différents types d'évolution.

1° ESSAIS FAITS AUX DÉPENS D'EXSUDAT VAGINAL LÉGER PAUVRE EN RICKETTSIES. (Evolution normale d'une souche de passage.) — Nous avons pu obtenir l'infection pulmonaire de la souris et la reproduire au cours de passages, même avec un exsudat vaginal léger pauvre ou très pauvre en rickettsies prélevé sur les cobayes de passage. Mais cette atteinte pulmonaire peu intense au départ s'accompagne de signes cliniques si peu marqués chez la souris qu'il est difficile d'obtenir ainsi de

(7) Paul GIROUD. *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 714 ; *Arch. Inst. Pasteur*, Tunis, **25**, 1936, p. 313.

(8) Paul GIROUD et René PANTHIER. *C. R. Soc. Biol.*, **135**, 1941, p. 228.

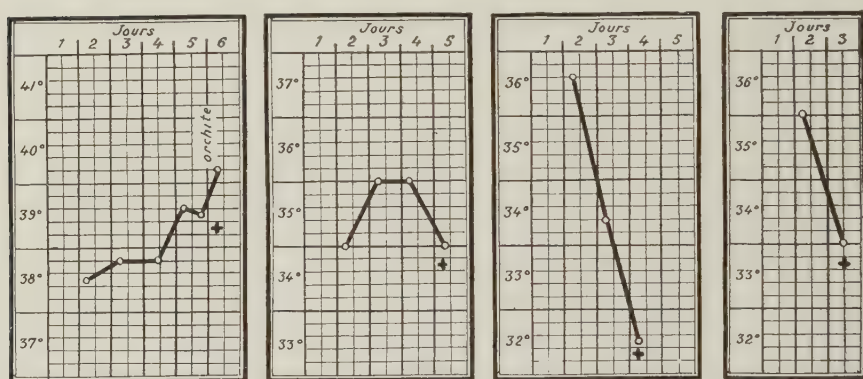
(9) MOOSER, VARELA et PILZ. *J. Exp. Med.*, **59**, 1934, p. 137.

(10) Paul GIROUD. *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 368.

véritables cultures étant donné l'absence de symptômes permettant de préciser le moment optimum du passage.

2° ESSAIS FAITS AUX DÉPENS D'EXSUDAT VAGINAL RICHE EN RICKETTSIES. (Evolution anormale d'une souche de passage.) — Un exsudat vaginal riche en rickettsies prélevé le sixième jour chez un cobaye de passage présentant une orchite, provoque chez la souris inoculée par voie respiratoire une maladie

TABLEAU I.



1. cobaye A.56, TR. (Exsudat vaginal Rick. +.)  
 2. Souris 1<sup>er</sup> passage. Rick. ++ corps rubis, enclaves roses.  
 3. souris 2<sup>e</sup> passage. Rick. ++++++++.  
 4. Souris 3<sup>e</sup> passage. Rick. ++++++++.  
 Le nombre de signes + indique la quantité de rickettsies.

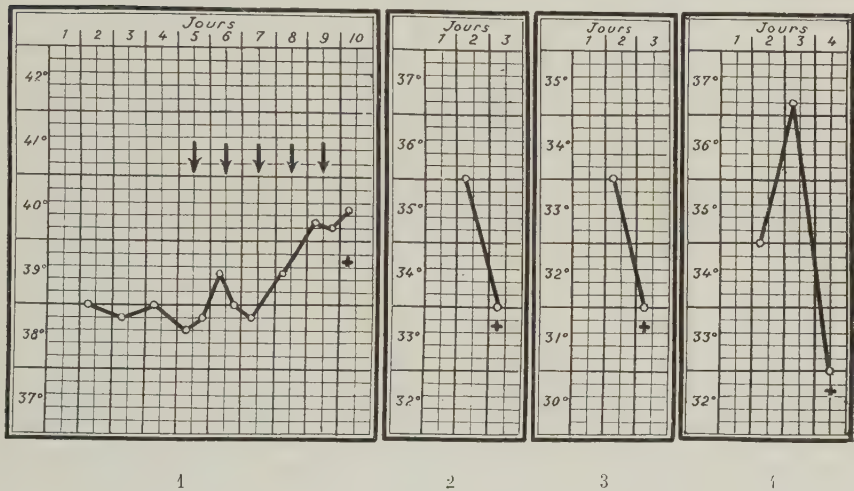
sérieuse. En effet les signes d'infection pulmonaire sont nets, la respiration est rapide, les poils sont hérissés et l'hypothermie plus ou moins marquée. Le cinquième jour, les souris du premier passage sont sacrifiées et au troisième passage on obtient, dès le troisième jour, une pullulation remarquable de rickettsies (tableau I).

3° ESSAIS FAITS AUX DÉPENS D'EXSUDAT VAGINAL AUGMENTÉ ARTIFICIELLEMENT. — La vaginale d'un cobaye traité par des injections intrapéritonéales d'extrait globulaire et sacrifié le

dixième jour sert à inoculer des souris. Quoique la maladie de la souris au premier passage soit moins nette que dans le cas précédent, on obtient des lésions pulmonaires importantes dès le troisième passage avec présence de rickettsies. Au cinquième passage, les rickettsies sont innombrables (tableau II).

Nous avons constaté avec A. Giroud que les bronchioles sont

TABLEAU II.



1, cobaye A.58 TR. Au sixième jour, légère réaction de la vaginale.

A l'autopsie, léger exsudat vaginal. Rick. +.

2, souris 1<sup>er</sup> passage, enclaves roses. Rick. 0.

3, Souris 2<sup>e</sup> passage, corps rubis. Rick. 0.

4, Souris 3<sup>e</sup> passage, corps rubis. Rick. ++.

presque normales avec quelques polynucléaires dans leur cavité. Les alvéoles présentent des lésions polymorphes, alvéoles à contenu fibrineux et leucocytes abondants, certains en pycnose.

Les rickettsies gonflent les petites cellules pulmonaires ou certains éléments ramifiés (peut-être vasculaires). D'autres fois elles remplissent les cellules pulmonaires nucléées bombant en surface. Quelques rickettsies sont visibles dans l'exsudat ou éparses dans les tissus et sur les cellules épithéliales des bronchioles. Le foie, le rein sont un peu congestionnés. La surré-

nale, le testicule sont presque normaux ; il en est de même pour le cœur, la rate, les ganglions lymphatiques.

CONCLUSION. — Comme nous l'avons vu par les exemples que nous venons de donner, on peut obtenir la culture de rickettsies du typhus historique dans le poumon de souris aux dépens de lésions pulmonaires du cobaye, du singe ou encore de l'exsudat vaginal ou péritonéal de cobayes aux premiers jours de la fièvre.

#### POUVOIR PATHOGÈNE.

Nous allons maintenant rapporter le pouvoir pathogène d'une de ces souches pour le cobaye et pour le rat.

I. COBAYE. — 1° *Suspension fraîche de poumon de souris* (tableau III). — Un poumon de souris broyé et mis en suspension aussitôt après l'autopsie, provoque chez le cobaye inoculé par voie péritonéale une maladie grave, très souvent mortelle, sans incubation. La température se maintient les premiers jours à peu près en plateau au voisinage de 40°5. La péri-orchite est importante dès le quatrième jour. Si l'on sacrifie l'animal le sixième jour, on constate un exsudat vaginal abondant avec de nombreuses rickettsies. Cet exsudat inoculé à la souris par voie respiratoire provoque directement une belle culture locale.

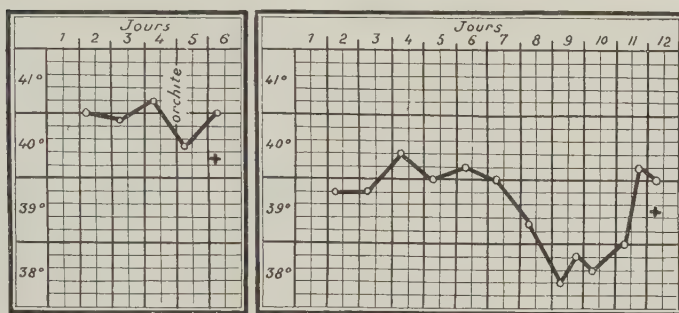
Par passages successifs sur cobaye, on note les premiers jours une diminution de l'hyperthermie alors que l'hyperthermie du dixième jour, onzième jour devient de plus en plus nette. En même temps, la période d'incubation réapparaît. Enfin, la réaction scrotale fait défaut, on obtient ainsi peu à peu une courbe typique de virus de typhus historique sur cobaye (tableau III), tel qu'on l'obtient toujours par passage cerveau-péritoine avec une souche bien fixée comme celle de Ch. Nicolle.

2° *Poumon conservé longtemps à l'état sec ou à basse température.* — Après les longues conservations à sec, on note un affaiblissement progressif du pouvoir pathogène pour le cobaye. Celui-ci peut même ne plus présenter d'hyperthermie mais seulement une très légère réaction scrotale le cinquième



ou le sixième jour. Par passage d'animal à animal, la maladie reprend vite son évolution habituelle, au cours de laquelle on constate l'hyperthermie après une incubation fixe. L'examen anatomo-pathologique décèle les nodules cérébraux

TABLEAU III.

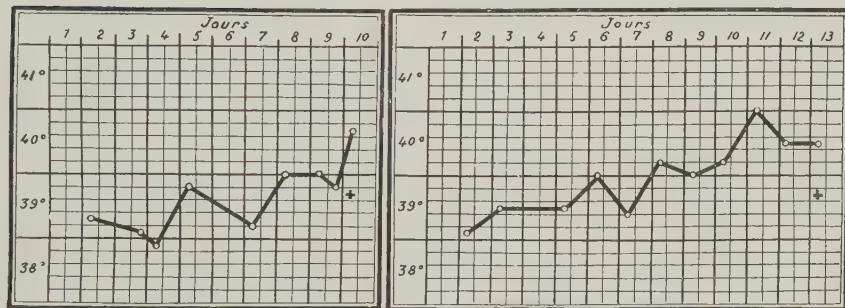


1

2

1, cobaye A63 TRSP, 1<sup>re</sup> passage. Souris 1740 TR.

2, Cobaye A65 TRSP, 2<sup>e</sup> passage.



3

4

3, cobaye A67 TRSP, 3<sup>e</sup> passage.

4, cobaye A85 TRSP, 4<sup>e</sup> passage.

caractéristiques. Enfin les animaux éprouvés sont résistants à l'inoculation péritonéale de virus Tunis Rabta cobaye ou de virus Breinl (11).

(11) L'immunité vis-à-vis de la souche Breinl a été recherchée par le Dr Snyder, de New-York, auquel nous avons envoyé la souche desséchée.

Après d'assez longues conservations à basse température sans préparation préalable, on constate des faits de même ordre en notant toutefois que les organes perdent plus rapidement leur virulence pour le cobaye, animal plus résistant que la souris.

II. RAT. — Le rat blanc inoculé avec de grandes quantités de rickettsies peut faire une maladie toxique assez spéciale. Dans les cas de gravité moyenne, on note souvent un petit clocher thermique au-dessus de 38° le cinquième jour. L'animal présente ensuite une phase d'hypothermie et peut mourir dans certains cas au bout d'un temps variable. Nous considérons ces réactions comme de véritables intoxications car chez le rat il n'y a pas dans ces conditions de culture de rickettsies.

DOSAGE DE LA VIRULENCE. — Nous avons montré dès 1938 que les réactions cutanées provoquées par les suspensions de rickettsies sont proportionnelles aux dilutions des divers virus qui provoquent une réaction du derme (12). Il est donc possible de doser approximativement la virulence par ce procédé. L'injection dans la peau de suspensions diluées provoque des réactions locales très vives s'accompagnant d'une nécrose importante et d'un nodule avec le 1/5.000 de poumon de souris. La virulence est au moins égale à celle que nous avons constatée pour la souche de P. Durand et H. Sparrow provenant du pou et prise comme témoin.

Le lapin inoculé par voie intradermique présente une température normale pendant toute la période où la peau réagit mais, au moment où les nodules commencent à disparaître, la température s'élève à 40° et persiste ainsi aux environs de 40° pendant quelques jours.

Enfin, nous avons déjà parlé du pouvoir pathogène pour le cobaye de ces organes hautement infectés. Cet animal étant sensible aux variations de virulence peut servir également, dans une certaine mesure, au dosage de celle-ci, la maladie

(12) Paul GIROUD. *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 397.

DOSAGE DE LA VIRULENCE DANS LA PEAU DU LAPIN

Doses de virus	Lapin A62		Durée du test					
	2	3	4	5	6	7	8	9
1/5.000	E	E ++ œ	E ++ N	E ++ N	E ++ N	++ N	N ++ f	N ++ f
1/500	E	E +++ œ	E +++ N	E +++ N	E ++ N	++ N	N ++ f	N ++ f
1/50	E	E +++ +++ œ	E +++ +++ N	E +++ +++ N	E +++ +++ N	N ++++ f	N ++++ f	N ++++ f

N, nécrose; +, réaction nodulaire; E, grand érythème; œ, œdème, f, réaction furfuracée.

qu'il présente étant en rapport avec l'intensité des réactions du lapin inoculé dans la peau.

VALEUR ANTIGÈNE DE LA SOUCHE (suspensions préparées à partir de poumons de souris). — Nous avons comparé des suspensions formolées récentes provenant de souris infectées avec une souche issue de la vaginale du cobaye et des suspensions préparées suivant la même technique, à partir de poumons de souris inoculés avec la souche de P. Durand et H. Sparrow et dont nous avons relaté les premiers essais avec P. Durand (13).

Les cobayes reçoivent à trois reprises par voie sous-cutanée 1 cent. cube de vaccin : les injections sont faites à huit jours d'intervalle. Ils sont éprouvés quarante-sept jours après la troisième injection par une inoculation intrapéritonéale de 1 cent. cube de caillot broyé dilué, provenant d'un cobaye de passage saigné au début de sa réaction thermique.

Les cobayes témoins sont divisés en quatre lots qui reçoivent 1 cent. cube de caillot dilué à 1/4, 1/40, 1/400, 1/4.000.

(13) Paul DURAND et Paul GIROUD. *C. R. Ac. Sc.*, **210**, 1940, p. 420 ; *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, **29**, 1940, p. 25.

Inoculés avec 1 cent. cube de caillot dilué à 1/400 ils présentent encore une température au-dessus de 40° du treizième au vingtième jour.

La température des cobayes éprouvés après la vaccination avec les suspensions de rickettsies de poumon de souris des diverses origines reste constamment aux environs de 39°. La courbe de poids de ces animaux ne présente aucune variation sensible, alors que les cobayes témoins inoculés avec le 1/4.000 de centimètre cube de caillot broyé maigrissent de 100 à 150 grammes.

On peut conclure que les animaux vaccinés sont parfaitement immuns et que la valeur antigène de la souche utilisée est la même que celle de la souche isolée du pou inoculé par voie rectale.

#### INOCULATION INTRATRACHÉALE AU LAPIN.

Après les essais favorables montrant le haut pouvoir pathogène de ces souches sur le cobaye et dans la peau du lapin, nous les avons essayées sur le lapin comme nous l'avons fait précédemment avec Paul Durand pour la souche venant du pou (14).

Le lapin inoculé par voie trachéale après anesthésie à l'éther avec un poumon de souris broyé, dilué dans 5 à 10 cent. cubes d'eau physiologique, réagit à cette inoculation de façon tout à fait comparable à ce que nous avons observé avec la souche isolée du pou par P. Durand et H. Sparrow. Les réactions thermiques sont assez variables, hyperthermie et souvent hypothermie. Le maximum de la maladie est le plus souvent observé le sixième jour. L'hépatisation pulmonaire rouge ou grise peut être totale et, à l'examen microscopique on constate soit des rickettsies, soit des corps dont nous allons parler lorsque nous étudierons le comportement des rickettsies au cours des passages.

**POUVOIR PATHOGÈNE.** — Le cobaye inoculé avec le poumon de lapin infecté par cette souche fait une maladie sévère avec

(14) Paul DURAND et Paul GIROUD. Ces *Annales*, 66, 1941, p. 425.

incubation courte s'accompagnant chez le cobaye mâle de réaction serotale. Dosé dans la peau, le poumon de lapin provoque des réactions au moins jusqu'au 1/5.000.

**POUVOIR ANTIGÈNE.** — Les suspensions provenant de poumon de lapin vaccinent le cobaye comme les suspensions de

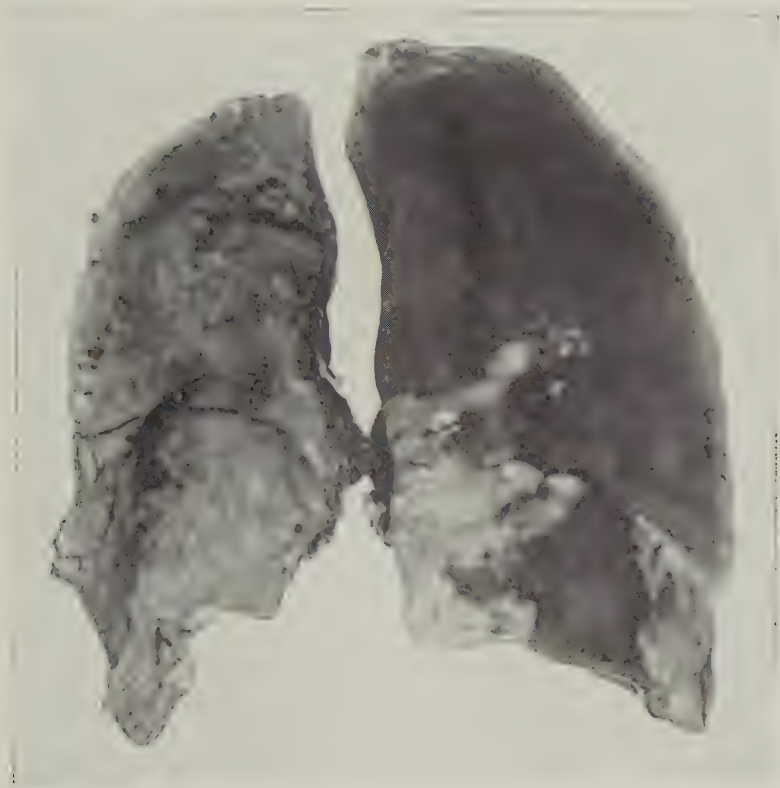


FIG. 1. — Poumon de lapin infecté par voie respiratoire avec un poumon de souris, souche venant directement du cobaye (virus historique). Le poids de ce poumon est de 43 grammes. L'hépatisation à gauche est totale, elle est partielle à droite. (Photo P. Jeantet)

poumon de souris ; les expériences comparatives sont très nettes à ce point de vue.

Nous rappelons cependant que, comme nous l'avons démontré et écrit avec P. Durand, seules les suspensions for-



molées riches en rickettsies sont antigènes. En effet les suspensions préparées à partir du poumon de lapin ne contenant que des corps homogènes colorés en rubis après la coloration de Macchiavello, ne donnant pas de rickettsies après broyage, ne vaccinent pas le cobaye. Nous devons rapprocher ce résultat de constatations que nous avons déjà faites en étudiant des formes anormales de rickettsies observées avec une souche de typhus murin adaptée à la souris et inoculée par voie péritonéale. Ces formes, comme nous l'avons vu depuis, ne gardent pas la fuchsine avec la technique de Macchiavello. Les modifications morphologiques des rickettsies, formes en anneau, en raquette, en virgule coïncident en effet avec une diminution très nette du pouvoir antigène de cette souche vis-à-vis du typhus historique et même du typhus murin. En même temps d'ailleurs cette même souche perd une partie de son pouvoir pathogène pour le cobaye de premier passage.

Le pouvoir antigène de suspensions formolées préparées à partir du poumon de souris ou de lapin infecté de typhus historique est donc lié aux caractères morphologiques et tinctoriaux des éléments virulents qui ont cultivé dans ces poumons. Le meilleur antigène est obtenu au départ des rickettsies bacillaires classiques, retenant bien les colorants basiques et venant de poumons fraîchement prélevés ou conservés à  $-25^{\circ}$  pendant peu de jours. Aussi allons-nous maintenant étudier le comportement des rickettsies au cours des passages.

#### COMPORTEMENT DES RICKETTSIES AU COURS DES PASSAGES.

Cet élément spécifique peut se présenter pour nous sous cinq formes : rickettsies bacilliformes, corps colorés en rouge rubis, soit homogènes, soit granuleux, enclaves colorées en rose, et enfin corpuscules punctiformes (15).

(15) Paul GIROUD et René PANTHIER, *C. R. Ac. Sc.*, **212**, 1941, p. 253 ; **213**, p. 45.

Toutes les descriptions que nous donnons au cours de cette étude se rapportent à des préparations faites après coloration suivant la technique décrite par MACCHIAVELLO : sur frottis non fixé, sec depuis quelques minutes, faire agir pendant cinq minutes la fuchsine basique à

Donatien et Lestoquard (16), étudiant des éléments analogues dans diverses rickettsioses dont la fièvre boutonneuse, concluent à un véritable cycle évolutif au départ des corps initiaux.

Carpano (17), d'autre part, a décrit un cycle pour une rickettsie trouvée dans *Pyrrula europea* et a généralisé cette conception aux diverses rickettsies (typhus exanthématique, fièvre boutonneuse, etc...).

Nous allons maintenant rapporter ce que nous avons observé au cours de nos expérimentations.

1° CE QUE L'ON CONSTATE AU COURS D'UNE ADAPTATION OU D'UNE RÉADAPTATION DE VIRUS. — Au cours de l'adaptation ou de la réadaptation d'un virus, on observe aux premiers passages une succession d'aspects analogues à ceux que l'on voit au cours de l'évolution de la pneumonie de la souris inoculée avec un virus adapté. Si le virus ne domine pas l'hôte qu'il infecte, les rickettsies sont rares ou absentes, mais on se trouve en présence d'éléments particuliers : enclaves roses et corps granuleux arrondis colorés en rouge rubis. Si le virus au contraire a conservé la plus grande partie de son pouvoir infectant, on peut noter la présence de rickettsies déjà en quantité notable, des enclaves roses et des corps rubis non homogènes à l'intérieur des cellules. Ces aspects sont surtout fréquents dans le poumon de souris. Sur le lapin, dont la résistance a été abaissée, on constate aussi des éléments rouges granuleux et de très nombreuses rickettsies. Par contre, dans le poumon de lapin non préparé il existe surtout des corps homogènes, véritables billes intracellulaires colorées en rouge rubis. Ces éléments sont aussi très nets dans le poumon de cobaye infecté par voie péritonéale avec un virus de typhus historique.

L'apparition ou la disparition des rickettsies au cours des

0,25 p. 100. Lavage rapide à l'eau. Le frottis est passé très rapidement à l'acide citrique à 0,5 p. 100. Lavage rapide à l'eau. Le fond de la préparation est légèrement coloré au bleu de méthylène à 1 p. 100. Lavage rapide à l'eau. Les rickettsies apparaissent en rouge rubis sur fond bleu.

(16) DONATIEN et LESTOQUARD. *C. R. Ac. Sc.*, 236, 1938, p. 1930.

(17) CARPANO. *Riv. di Parasitol.*, 3, 1939, p. 293.

passages pour l'entretien des souches est particulièrement instructive. Pour chaque lot de souris blanches, venant d'élevages différents, il y a une période plus ou moins longue d'adaptation pendant laquelle les rickettsies ne cultivent pas en abondance et où l'on constate des corps rouges granuleux et des éléments punctiformes soit rouge rubis, soit bleus. Ces éléments peuvent par passages successifs redonner des rickettsies classiques. Au cours de passages de souris blanches à souris grises on peut constater des faits analogues.

2° INTERPRÉTATION DE CES FORMES. — *Les rickettsies bacilliformes* se reproduisent immédiatement sous la même forme quand elles se trouvent dans de bonnes conditions de développement, réalisant ainsi une véritable culture. Nous considérons ces éléments bacillaires comme une forme de multiplication rapide, mais peu résistante, comparable à l'état habituel des bactéries se développant en milieu électif. Elles provoquent toujours une forte réaction cutanée lorsqu'on les inocule dans la peau et de fortes réactions générales chez les animaux inoculés dans le péritoine. Elles sont de bons antigènes.

*Les corps granuleux rouge rubis* (de 1 à 5  $\mu$ ) correspondent à des rickettsies agglutinées ou agglomérées. On peut le démontrer d'une façon très simple, car il suffit de broyer les tissus ne contenant que ces éléments. Après centrifugation fractionnée, on met en évidence une quantité considérable de rickettsies bacilliformes dans le tissu broyé, ce que l'on voit fréquemment chez le lapin dont la résistance n'a pas été suffisamment diminuée.

*Les corps homogènes rouge rubis.* — On les constate dans les poumons d'animaux inoculés avec un virus historique par voie péritonéale ou chez le lapin qui a résisté à l'envahissement par les rickettsies. Ces éléments ont de 1 à 2  $\mu$ . Ils apparaissent comme de véritables billes rouge rubis dans le protoplasme bleu des cellules. On ne peut les fragmenter par broyage, leur cohésion ou leur coagulation rendent cette fragmentation impossible. Des corps homogènes de même aspect peuvent être mis en évidence à l'intérieur des grandes cellules épithéliales du péritoine du cobaye et être provoqués par des bactéries. En effet, on sait que si l'on inocule dans le péri-

toine du cobaye un mélange de sérum anticholérique et de vibron cholérique, on constate la lyse de cet organisme. Lorsque le vibron cholérique a disparu du liquide péritonéal, on voit de gros éléments rubis arrondis, homogènes, à l'intérieur des cellules épithéliales. Ces éléments d'origine bactérienne sont analogues à ceux que nous décrivons pour les rickettsies chez les animaux résistants.

*Les enclaves roses* sont mises en évidence quand le virus est relativement peu actif vis-à-vis de la défense cellulaire ; elles se rencontrent surtout au début de l'adaptation d'une souche au poumon de souris et l'on doit également rappeler qu'on les trouve parfois en quantité considérable dans la vaginale du cobaye infecté de typhus historique, où l'on ne voit généralement pas de rickettsies.

*Les éléments punctiformes rouges ou bleus* ont  $1/10$  de  $\mu$  environ et peuvent être aussi interprétés très facilement si l'on inocule un produit conservé plusieurs mois à sec (six mois à  $8^{\circ}$  et quarante-cinq jours à  $+ 20^{\circ}$  par exemple). Quoique le frottis du produit sec examiné extemporanément ne contienne que des rickettsies bacilliformes, les frottis de poumons de souris de premier passage ne montrent que des éléments punctiformes rubis ou bleus. Par passages successifs, on voit disparaître ces éléments et apparaître les rickettsies classiques. De plus, en étudiant *in vitro* l'action virulicide d'un sérum de cheval (préparé par l'injection de suspension de poumons de lapins infectés et formolés) sur des rickettsies, nous avons pu voir les modifications suivantes. Les rickettsies d'abord uniformément colorées en rubis, après un certain temps de contact avec le sérum anti ne présentent plus qu'une coloration bipolaire rubis. Elles ont alors la forme d'une haltère avec centre bleu, puis le centre même disparaît ; les points rubis se séparent et, à un stade ultérieur, ils sont remplacés par des éléments bleus.

Toutes ces formes ne provoquent pas de réactions locales importantes ni chez le lapin, ni chez le cobaye. Ces éléments peuvent cependant infecter les animaux sensibles mais ce n'est qu'à la suite de passages successifs qu'on voit réapparaître les rickettsies.

Nous devons cependant considérer que la forme de résis-

tance du virus ne doit pas être la forme bacillaire, car les rickettsies bacilliformes qui se multiplient si bien dans certains tissus sont très fragiles et conservent souvent très mal leur virulence.

Toutes ces constatations nous permettent de conclure qu'au cours des passages, ou pendant la réadaptation d'une souche, on peut voir les rickettsies, modifiées d'abord par les tissus, reprendre l'aspect normal qu'elles ont dans une culture intensive.

#### CONCLUSION.

1° Il est possible d'adapter directement au poumon de souris un virus de typhus historique isolé et conservé sur cobaye. Cette adaptation est d'autant plus facile que l'organe qui sert au passage est plus riche en rickettsies. Chez les cobayes faisant une maladie à évolution normale, on peut en augmenter artificiellement la quantité par divers procédés.

2° Après un nombre variable de passages, l'adaptation est complète. Au cours de cette adaptation on peut étudier les divers aspects sur lesquels certains auteurs se sont basés pour décrire aux rickettsies un cycle évolutif. Ces formes pour nous représentent le résultat de la lutte entre le protoplasme de la cellule et le virus. C'est ainsi que celui-ci est modifié.

3° Le pouvoir pathogène des poumons ainsi infectés est considérable pour le cobaye, mais baisse rapidement après conservation un peu prolongée soit à sec, soit par le froid.

Par passages en série sur cobaye ou sur souris, on obtient de nouveau une infection typique de ces animaux.

4° L'inoculation intratrachéale au lapin de poumon de souris broyé est suivie d'une hépatisation pulmonaire importante et permet une récolte abondante de rickettsies.

5° Enfin, des cobayes vaccinés avec des suspensions formolées préparées à partir de poumon de souris ou de lapin inoculés avec cette souche sont immunisés d'une façon parfaite contre la souche de passage inoculée par voie péritonéale.



# ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

**Séance du 8 janvier 1942.**

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

---

## COMMUNICATIONS

### **ACTION DE LA DESSICCATION SUR QUELQUES ULTRA-VIRUS NEUROTROPES**

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

L'Institut Pasteur de Tanger poursuit depuis de nombreuses années l'étude de la dessiccation sur les ultra-virus : rage, maladie d'Aujeszky, encéphalomyélite des équidés. La communication de MM. Verge et Goret (1) nous fournit l'occasion de faire le point des résultats obtenus. Les expériences n'ont pas été entreprises avec l'appareil de Flosdorf et Mudd que nous n'avions pas à notre disposition. Elles ont été réalisées plus simplement ; sans congélation, en desséchant rapidement les virus sous une cloche de verre, en présence de chaux vive. Le procédé est à la portée de tous les laboratoires et les résultats paraissent sensiblement identiques.

**VIRUS RABIQUE.** — L'un de nous a été le premier (1908) à répéter l'expérience de Vansteenberghe et à en faire ressortir l'importance. Ultérieurement (2) nous avons montré que c'était la dessiccation rapide de la pulpe nerveuse étalée en couche mince à la surface d'une lame de verre et non la dessiccation

(1) Séance du 2 octobre, ces *Annales*, 1941, **67**, 367.

(2) P. REMLINGER et J. BAILLY, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 133 ; *id.*, ces *Annales*, 1940, **65**, 130.

lente des moelles en flacon de Mariotte en présence de la potasse qui traduisait la véritable action de la dessiccation sur le virus rabique. Nous en avons conclu que la dessiccation était un facteur de conservation du virus alors qu'il était classique de la ranger parmi les facteurs d'atténuation. Dans les flacons de Mariotte où sont suspendues les moelles, l'atténuation du virus est sous la dépendance non pas de la dessiccation, mais de l'autolyse qui préside à la maturation du tissu nerveux comme, dans la nature, elle préside à l'hydrolyse de tous les tissus parenchymateux et à la maturation des viandes de boucherie. La condition essentielle de réussite de la dessiccation sous cloche réside dans la rapidité de l'opération, elle-même sous la dépendance de la minceur de la couche de substance nerveuse à dessécher et surtout dans l'absence complète d'humidité. Des traces minimales de vapeur d'eau font perdre rapidement à la poudre sa virulence, tandis qu'à l'abri de l'air et de la lumière, celle-ci se conserve des mois, sinon des années. Fait inattendu, ainsi desséché en couche mince, le virus rabique dont on connaît le peu de résistance à la chaleur acquiert la propriété de résister à des températures supérieures à 100° C. Cette thermorésistance n'est pas en faveur de l'hypothèse protozoairienne, mais en faveur de l'hypothèse protéinique. Un autre fait inattendu est que, si au lieu de faire agir sur la poudre des traces d'humidité, celles par exemple qui sont contenues dans l'air atmosphérique, on fait agir un excès de cette même humidité, la destruction du virus au lieu d'être plus rapide est considérablement retardée. Tout se passe comme si l'excès d'humidité exerçait une action inhibitrice sur les protéases cellulaires du tissu nerveux à l'égard du virus rabique. Nous reviendrons sur cette question encore à l'étude.

**VIRUS DE LA MALADIE D'AJESZKY.** — Le virus d'Aujeszky est cinquante fois plus résistant que le virus rabique à la dessiccation lente. C'est, en effet, entre le cent quatre-vingt-treizième jour et le deux centième jour que disparaît la virulence dans les moelles suspendues en flacon de Mariotte. Soumis à une dessiccation rapide en couche mince sous une cloche à vide en présence de la chaux vive, il se comporte au contraire comme le virus rabique. En effet, dans les moelles exposées en flacons de Mariotte à la dessiccation lente par la potasse, la disparition de la virulence est entravée par l'antagonisme entre la protéase cellulaire banale et le ferment neurolytique spécial à la maladie d'Aujeszky, ferment extrêmement énergétique dont nous avons signalé l'existence dès 1933, le premier subissant de la part du second une véritable inhibition. Dans la pulpe étalée en couche mince et soumise en atmosphère close, en présence de la chaux vive, à une dessiccation rapide et brusque, les diastases de désintégration sont inhibées immédiatement et indistinctement. La

poudre obtenue par dessiccation rapide est capable de résister deux minutes à des températures de 102°, 103°, 104° C alors qu'en émulsion dans la solution physiologique ou dans le liquide de Ringer, il suffit d'une température de 60° maintenue pendant quarante-cinq à soixante minutes pour obtenir la perte de la virulence.

**VIRUS DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE DES ÉQUIDÉS.** — Le virus de l'Est américain se comporte à l'égard de la dessiccation comme le virus rabique et le virus d'Aujeszky. La poudre obtenue par la dessiccation rapide d'un cerveau de cobaye conserve sa virulence pendant des mois si elle est préservée de toute trace d'humidité. Alors qu'une émulsion de ce cerveau est détruite par une température de + 51° maintenue dix minutes, la poudre supporte des températures de 110°, 111° et 112° C maintenues cinq et dix minutes. La nature des ultra-virus, des « contagés » (Edmond Sergent) est à l'ordre du jour. Il semble — nous le répétons à dessein — que cette thermorésistance constitue un argument important en faveur de leur nature protéinique. En dehors donc des applications pratiques susceptibles d'être tirées de la dessiccation rapide des virus neurotropes en vue de leur conservation économique ou de leur expédition, l'étude de cette action physique comporte des enseignements doctrinaux intéressants sur des principes pathogènes dont la nature est encore mystérieuse.

*(Institut Pasteur de Tanger.)*

**M. Lépine :** Dans leur intéressante communication, MM. Remlinger et Bailly apportent une confirmation de la valeur de la méthode de dessiccation simple pour la conservation des virus telle que nous l'avons étudiée et en avons apporté ici même les résultats avec M<sup>lle</sup> Sautter (1). Rappelons que nos durées de conservation, sans que la limite de conservation soit atteinte, ont été pour les virus considérés par MM. Remlinger et Bailly, de mille trois cent quatre-vingt-quatorze jours (virus rabique fixe), neuf cent quatre-vingt-dix-sept jours (virus des rues), neuf cent soixante-dix-sept jours (maladie d'Aujeszky) et cinq cent trente-trois jours (encéphalomyélite équine américaine).

La sensibilité différente d'un virus aux divers agents physiques, parmi lesquels le chauffage, suivant que l'action est exercée à l'état frais ou à l'état sec, est un phénomène indépendant de la nature vivante ou inanimée de ce virus. Il est, comme l'ont montré Lacassagne et Rouyer (2), à propos des rayons X et du radium, sous la dépendance de l'état d'imbibition des molécules. Le

(1) P. LÉPINE et V. SAUTTER, séance du 2 octobre 1941, ces *Annales*, 1941, 67, 371.

(2) A. LACASSAGNE et M. ROUYER, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, 434.

phénomène est général et il a été observé sur des substances aussi dissemblables que des graines végétales ou des venins de serpents. Il est à la base même des méthodes pastoriennes de stérilisation par la chaleur sèche et par la chaleur humide.

L'hypothèse de la nature protozoaire du virus rabique ne paraît plus guère soutenable aujourd'hui à la lumière des travaux récents sur les virus. Quant au virus de l'encéphalomyélite équine américaine, type Est, il a été isolé au moyen de l'ultracentrifugation par Taylor, Gordon Sharp et Beard (3) à l'état de protéine pure mono-dispersée, stable entre pH 6,5 et pH 8,5, avec une  $S_{20}$  de  $250 \times 10^{-13}$  environ.

## TRANSMISSION DE L'INFECTION A BACILLE DE WITHMORE PAR INSECTES PIQUEURS

### I. — MALADIE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

par GEORGES BLANC et MARCEL BALTHAZARD.

Ce travail paraîtra sous forme de *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

## ACIDE INDOL-3-ACÉTIQUE ET BACTÉRIES ANAÉROBIES

par A.-R. PRÉVOT et P. CORDIER.

I. — Les nombreux travaux réalisés depuis quelque temps sur le rôle de l'acide indol-3-acétique en physiologie végétale (1) nous avaient incités à rechercher d'abord si les bactéries anaérobies étaient capables de produire en culture cette remarquable substance. Pour la caractériser, nous avons utilisé la réaction de Herter modifiée par A. Berthelot, G. Amoureux et S. Deberque (2),

(3) A. R. TAYLOR, D. GORDON SHARP et J. W. BEARD, *J. inf. Dis.*, 1940, **67**, 59.

(1) Voir à ce sujet la remarquable revue générale de JANOT et LACHAUX, *Rev. Scientif.*, 1941, 163.

(2) A. BERTHELOT, G. AMOUREUX et S. DEBERQUE, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 981.

réaction extrêmement sensible et absolument négative dans le bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000 que nous avons employé pour ces recherches. Or sur 50 souches anaérobies de notre collection appartenant à 37 espèces différentes nous en avons trouvé 20 appartenant à 10 espèces différentes, donnant une réaction de Herter positive. Mais ces 20 souches étant en même temps fortement indologènes, et la réaction de Herter n'étant pas spécifique de l'acide indol-3-acétique, mais du groupe de l'indol, il était impossible de conclure. Nous avons donc cherché une méthode permettant de caractériser la première de ces substances dans des cultures produisant la deuxième. Deux méthodes, toutes deux découlant de travaux anciens de A. Berthelot (3), nous ont permis de faire ces recherches :

1° L'indol-3-acétate de sodium étant rigoureusement insoluble dans l'éther, il suffit d'éliminer l'indol des cultures par 7 ou 8 extractions après neutralisation par la soude au 1/10 et de pratiquer la réaction de Herter sur la culture ainsi traitée. Or après cette manœuvre, toutes les réactions de Herter dans les cultures précitées étaient devenues totalement négatives. Par conséquent, aucun des anaérobies que nous avons étudiés ne produit d'acide indol-3-acétique.

2° Comme en pratique courante, une série d'extractions à l'éther est longue et délicate, nous avons préféré une méthode plus rapide, plus simple et plus efficace. Elle est fondée sur le fait que l'indol est rapidement et totalement entraînable à la vapeur, alors que l'indol-3-acétate de sodium ne l'est pas. On neutralise donc la culture par la soude au 1/10, et on la soumet à une distillation par entraînement à la vapeur. En très peu de temps l'indol est totalement éliminé (fait qu'on peut contrôler à la fois par les réactions de Herter et d'Ehrlich) et on pratique alors la réaction de Herter sur la culture traitée. Le résultat fut dans ce cas le même que dans la première recherche, et la conclusion de cette première partie de notre travail est qu'on ne connaît à l'heure actuelle aucun anaérobie capable de produire de l'acide indol-3-acétique.

II. — Considérant le fait que de nombreuses espèces anaérobies sont capables de produire simultanément de l'indol et de l'acide acétique et incapables de produire l'hétéro-auxine, nous avons recherché si ce fait n'était pas dû à la possibilité pour ces espèces de détruire cette phytohormone.

Nous avons réalisé cette deuxième partie de notre travail en ensemençant des souches anaérobies dans des bouillons V. F. glucosés à 2 p. 1.000 et additionnés après désaération par ébullition de X ou de XX gouttes de la solution à 1 p. 1.000 (stérilisée

(3) A. BERTHELOT. *Thèse de Médecine*, Paris, 1913. Barnéoud, imp.



à part) d'acide indol-3-acétique. Il est facile de voir que cette substance ne se détériore ni au cours de la stérilisation à 109° pendant vingt-cinq minutes, ni au contact du bouillon V. F., ni après incubation à 37° pendant le même temps que les tubesensemencés, en faisant des témoins sur lesquels la réaction de Herter reste fortement positive. Nous avons pu ainsi constater qu'en anaérobiose stricte, *W. perfringens* (souches Mayer et Dereck), *Cl. septicum* (souche Ch x), *Cl. œdematiens* (souche pcl) et *Cl. fallax* (souche Tracol) sont capables de détruire complètement 0,5 mg. d'acide indol-3-acétique pour 5 cc. de bouillon, soit 1 cg. pour 100 cc. de bouillon. En recherchant la teneur maximum de cette substance détruite par la souche Mayer de *W. perfringens* (qui est la souche la plus active que nous possédions actuellement), nous avons vu qu'elle est de 2 cg. pour 100 cc. de culture en quarante-huit heures. Il se peut qu'il y ait là un ordre de faits parallèles à ceux qui ont été désignés par Schoen sous le nom de « spécificité par carence » ; des bactéries anaérobies sont incapables de produire l'acide indol-3-acétique parce qu'elles le détruisent. Ces faits sont susceptibles d'éclairer le métabolisme de l'acide indol-3-acétique dans le sol, car on voit que les espèces anaérobies précitées qui le détruisent sont des anaérobies vivant dans les sols arables.

III. — Comme l'acide indol-3-acétique est doué d'une activité remarquable en physiologie végétale, nous avons recherché si cette destruction apportait une modification dans l'utilisation du glucose et la production de l'acidité volatile par *W. perfringens*. Pour cela, nous avons divisé un lot de bouillon V. F. glucosé à 1 p. 100 en parties égales réparties en fioles à fermentation, dont les unes sont additionnées extemporanément de 0,15 g. d'acide indol-3-acétique en solution stérile et dont les autres servent de témoin. La souche Mayer, très active, accomplit sa fermentation en cinq jours dans les uns comme dans les autres, sans qu'on voie de différence macroscopique. Après ce délai, on dose le glucose restant par la méthode de G. Bertrand, l'acidité volatile et le rapport  $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide butyrique}}$  par la méthode de Duclaux. Dans une première expérience, nous avons vu que la souche Mayer détruit 3,52 g. de glucose dans le témoin sans hétéroauxine, y produisant une acidité volatile de 0,172 g. p. 100 et un rapport  $\frac{A}{B}$  compris entre 4 et 5, alors qu'en présence d'hétéroauxine, elle détruit 4,55 g. de glucose, produit 0,190 g. d'acides volatils et donne un rapport  $\frac{A}{B}$  compris entre 2 et 3.

Dans une deuxième expérience, les résultats ont été du même

ordre ; culture sans hétéroauxine : glucose détruit 4 g. ; acidité volatile 0,09 g. p. 100 ; rapport  $\frac{A}{B} = 5$ . Culture additionnée d'hétéroauxine : glucose détruit 4,4 g., acidité volatile 0,096 p. 100, rapport  $\frac{A}{B} = 4$ . Donc dans les deux expériences nous avons vu que l'hétéroauxine provoque une légère augmentation de la consommation du glucose, une légère augmentation de l'acidité volatile et une modification du rapport  $\frac{\text{acétique}}{\text{butyrique}}$  dans le sens d'une production relativement plus élevée d'acide butyrique.

*Conclusions* : On ne connaît jusqu'ici aucun anaérobie capable de produire l'indol-3-acétique. Par contre, certains anaérobies sporulés telluriques (*W. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. œdematiens*, *Cl. fallax*) sont capables de le détruire. Cette substance agit en augmentant légèrement la fermentation du glucose, le taux de l'acidité volatile de fermentation et change le rapport des acides volatils en faveur de l'acide butyrique.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

## SUR LA CONSERVATION DU BACILLE MORVEUX DESSÉCHÉ SOUS LE VIDE APRÈS CONGÉLATION

par Ach. URBAIN, J.-P. THIERY et R. COURTADE.

Les cultures de bacille morveux perdent ordinairement très vite leur vitalité ; ce qui oblige à des repiquages fréquents dans les laboratoires où l'on entretient des souches de ce germe. Les cultures sur pomme de terre, conservées à l'obscurité, à la température ordinaire du laboratoire, meurent habituellement en moins d'un mois ; ce délai peut être porté à trois mois en utilisant un milieu de sérum normal de cheval, dilué dans la proportion de 1 p. 3 dans de l'eau distillée. Le produit de raclage de culture sur gélose est émulsionné dans ce milieu, et le tout est gardé en tubes scellés à la glacière (1).

Nous avons essayé d'appliquer à la conservation du bacille morveux l'action de la dessiccation rapide en utilisant l'appareil

(1) COURMONT et PANISSET, *Précis de microbiologie*. O. Doin et Fils, Paris.

de E. W. Flosdorf et S. Mudd (2). Cet appareil permet de dessécher rapidement sous le vide, après congélation, les microbes ou tissus riches en virus qui sont soumis à son action. Cette méthode a déjà été appliquée à la conservation de certains germes ou de virus filtrables [streptocoques (3), virus de la maladie de Carré, de la variole aviaire, de la peste porcine, de la fièvre aphteuse (4), etc.].

La technique suivie a été la suivante : des cultures de quatre jours sur gélose à la pomme de terre glycinée de M. Nicolle sont émulsionnées dans une faible quantité d'eau physiologique, de façon à fournir une émulsion assez dense. La suspension ainsi obtenue est centrifugée et lavée à l'eau physiologique stérile. Une solution de gomme arabique à 10 p. 100 est additionnée à l'émulsion de bacilles à raison de 1 p. 10 en volume. Cette émulsion est ensuite répartie en ampoules (1 cc. par ampoule) ; les ampoules étant fixées sur la rampe à vide de l'appareil sont plongées dans un mélange réfrigérant de carboglace et de méthylglycol pendant dix minutes. Lorsque la congélation est totale, l'action du mélange réfrigérant est arrêtée, et la pompe à vide est mise en marche. La dessiccation complète est obtenue en dix-huit heures environ : il reste alors dans le fond des ampoules une mince et fragile pellicule blanche formée par les corps microbiens desséchés.

Les ampoules scellées ont été divisées en 2 lots, après vérification du vide à leur intérieur : 1 lot n° 1 a été conservé à l'obscurité, à la température du laboratoire, le lot n° 2 étant mis à la glacière à + 5°.

Pour réensemencer les germes ainsi desséchés, sur les milieux usuels, il suffit d'introduire à la pipette dans l'ampoule une petite quantité de bouillon glyciné à 4 p. 100. Après agitation, le contenu de l'ampoule se remet en suspension et sert à ensemençer les milieux de culture.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

1° *La dessiccation rapide sous le vide du bacille morveux n'altère pas sa vitalité.* — En effet, neuf mois après la dessiccation, le contenu des ampoules conservées à la température du laboratoire a fourni des cultures normales.

Les premiers ensemencements ont été faits sur trois milieux : gélose pomme de terre glycinée, pomme de terre glycinée, bouillon glyciné. Jusqu'au dixième jour de conservation, les cultures se sont développées indifféremment sur chaque milieu. Par la suite, seules les cultures sur bouillon glyciné ont poussé, mais elles ont toujours permis d'obtenir secondairement des cultures sur les autres milieux.

(2) E. W. FLOSDORF et S. MUDD, *J. Immunol.*, 1935, **29**, 389 et 1938, **34**, 469.

(3) P. HAUDUROY, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 692.

(4) J. VERGE et P. GORFF, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1941, **67**, 367.

Les ensemencements effectués dix mois après la dessiccation n'ont donné aucune culture. Les ampoules mises à la glacière ont fourni des résultats comparables ; dans un cas, cependant, le contenu d'une ampoule a permis d'obtenir une culture au dixième mois de sa conservation.

2° La *virulence* du bacille morveux est également conservée par la dessiccation : la culture obtenue à partir d'une ampoule, huit mois après sa préparation, inoculée à un cobaye mâle par voie intra-péritonéale, a provoqué chez cet animal l'apparition, au bout de six jours, d'une orchi-vaginalite spécifique. Le pus ensemencé a fourni une culture pure de bacille morveux, alors que le sérum de cet animal, éprouvé *in vitro*, déviait très fortement le complément en présence de l'antigène morveux. Par contre, les cultures réalisées avec des ampoules ayant neuf mois de date sont restées avirulentes.

En résumé, il résulte, de nos essais, que la dessiccation rapide sous le vide après congélation, n'altère ni la vitalité ni la virulence du bacille morveux. Sous la forme desséchée, le bacille morveux reste vivant au moins neuf mois, qu'il soit conservé à la température ordinaire du laboratoire ou à la glacière, et sa virulence persiste pendant huit mois.

Il est, en outre, intéressant de souligner, du point de vue général, que la *dessiccation rapide* n'altère en rien le bacille morveux, alors que, comme il est classique de l'admettre (5), la dessiccation lente dans les produits pathologiques (jetage, pus, exsudats), exposés à l'air libre, lui enlève rapidement, en quelques jours, sa vitalité.

(Laboratoire d'*Ethologie des Animaux sauvages*  
du Muséum national d'Histoire naturelle.)

(5) COURMONT et PANISSET, *Loc. cit.*, 1914.

**SUR LA PRODUCTION DES TOXINES MICROBIENNES  
AU MOYEN D'UN NOUVEAU MILIEU DE CULTURE  
A BASE DE DIGESTION PAPAINIQUE DE VIANDE  
APPLICATION A L'OBTENTION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE  
DESTINÉE A LA PRÉPARATION  
DE L'ANATOXINE CORRESPONDANTE**

par GASTON RAMON, M<sup>lle</sup> GERMAINE AMOUREUX et JACQUES POCHON.

La production des toxines microbiennes et spécialement celle des toxines destinées à la préparation, en grandes quantités, des anatoxines diphtérique, tétanique, staphylococcique, etc., était le plus souvent réalisée jusqu'à ces derniers temps, en France comme à l'étranger, en utilisant des milieux de culture à base de digestion pepsique ou trypsique et de viandes ou d'extraits de viandes de boucherie variées.

C'est ainsi que, par exemple, la toxine diphtérique était en général obtenue, chez nous, à l'aide d'hydrolyse pepsique d'estomac de porc additionnée de macération de viande de veau [milieu Martin] (1), la toxine tétanique au moyen d'une digestion pepsique de viande de bœuf et de foie [milieu V. F. adapté par Prévot] (2).

Les événements et les difficultés qui en résultent nous ont incités à rechercher des formules de milieux plus économiques, d'une préparation plus commode et cependant capables de fournir des toxines, et partant, des anatoxines de valeur antigène élevée.

Dès septembre 1940, prévoyant la raréfaction et le rationnement des denrées alimentaires d'origine carnée, nous avons établi, puis fait connaître (3) que l'on peut avantageusement remplacer la viande de bœuf de bonne qualité jusque-là employée pour la production de la toxine tétanique, par de la viande de cheval impropre

(1) En ce qui concerne la production de la toxine diphtérique à l'aide du milieu Martin, voir G. LOISEAU et M. PHILIPPE, ces *Annales*, 1939, **62**, 469. Voir également, G. RAMON, *Rev. Immunol.*, 1939, **5**, 385.

(2) Pour ce qui concerne la production de la toxine tétanique, consulter G. RAMON, *Rev. Immunol.*, 1939, **5**, 394.

(3) G. RAMON et M<sup>lle</sup> G. AMOUREUX, *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **241**, 304.



à la consommation de l'homme et provenant, soit de chevaux four-nisseurs de sérum et sacrifiés pour des raisons diverses, soit d'animaux saisis aux abattoirs.

Les estomacs de porc, la pepsine elle-même et la trypsine devenant de plus en plus difficiles à se procurer, nous avons étudié, durant ces derniers mois, la préparation d'un milieu à base de digestion de viande de cheval au moyen de la papaïne dont nous possédions un certain stock.

Au cours d'une centaine d'essais effectués dans les conditions les plus variées, nous avons établi, en premier lieu, plusieurs formules-types de ce milieu spécialement adapté à la production de la toxine diphtérique et aussi de la toxine staphylococcique. Nous donnerons, ici, l'une des ces formules en l'accompagnant de détails techniques d'application.

4 kg. de viande de cheval (4) [impropre à l'alimentation], dégraissée et hachée, sont mis dans 18 litres d'eau (soit 225 g. par litre) préalablement portée à 50°, en cuve de porcelaine. Le mélange est chauffé au bain-marie, et quand la température atteint à nouveau 50°, on ajoute 36 g. (soit 2 g. par litre) de papaïne [titre 666] (5). La réaction du mélange, sans addition de soude ou d'acide, se trouve être dans une zone de pH favorable à l'action de la papaïne. On chauffe alors de telle sorte que la température s'élève à 85° en une heure. On assiste entre 65 et 70° à une disparition presque totale de la viande en suspension. Le liquide est ensuite siphonné, filtré sur papier dit « mou », amené à pH 8,4, additionné de 5 p. 1.000 de levure fraîche de boulangerie (6), chauffé pendant un quart d'heure à 90° et filtré sur papier « dur ». On vérifie la réaction du bouillon qui est additionné de 5 p. 1.000 d'acétate de sodium (7) réparti en ballons de Fernbach de 2 litres à raison de 500 cc. de liquide par ballon et stérilisé à l'autoclave à 112° pendant trente minutes.

On ajoute aseptiquement dans chaque ballon une solution stérile contenant 1,25 g. de glucose (8) et 3 g. de maltose (sous le volume de 15 cc.). L'ensemencement ayant été effectué à l'aide de la souche de bacille diphtérique dite « Américaine n° 8 » de W. Park et Anna Williams, le milieu est maintenu à l'étuve à 35° pendant douze jours.

(4) D'autres produits animaux pourront sans doute être utilement soumis à la digestion papainique pour la préparation des milieux de culture. C'est ainsi que nous étudions actuellement l'utilisation dans ce but, des caillots de sang, déchets de la production des sérums, le cœur de cheval, etc...

(5) D'après la méthode de titrage employée par les Etablissements Vaillant et C<sup>ie</sup> qui nous ont obligeamment fourni cette papaïne.

(6) SPRONCK, ces *Annales*, 1898, **12**, 701 ; P. BORDET, ces *Annales*, 1938, **61**, 618 ; A. MUSTAFA, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 615.

(7) G. RAMON et A. BERTHELOT, *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 530.

(8) G. RAMON, *C. R. Acad. Sci.*, 1929, **189**, 718.

Après filtration des cultures sur bougies L<sup>3</sup>, la richesse en toxine diphtérique des filtrats ainsi obtenue est appréciée au moyen de la réaction de floculation ; elle est très généralement comprise, dans les conditions de nos essais, entre 40 et 50 unités, valeur comparable à celle des meilleures toxines préparées à partir du milieu à base d'hydrolyse pepsique de panses de porc (peptone Martin). Le pouvoir toxique de nos filtrats est tel qu'ils renferment au centimètre cube de 3.500 à 4.000 doses mortelles, pour le cobaye de 250 g.

La toxine staphylococcique que nous avons préparée avec P. Mercier, à l'aide du même milieu (sans sucres, ni acétate et avec ou sans levure) et sur l'obtention de laquelle nous aurons l'occasion de revenir, titre en moyenne 10 à 12 unités au centimètre cube.

La toxine diphtérique comme la toxine staphylococcique ainsi obtenues peuvent être transformées sans difficultés en anatoxines spécifiques, selon le procédé maintenant classique mettant en jeu l'action simultanée du formol et de la chaleur.

L'analyse chimique d'un bouillon préparé, comme il vient d'être dit, nous a révélé les caractéristiques suivantes : extrait sec, 40 g. par litre, azote total 4,5 g. par litre, azote aminé, 1 g. par litre.

Notre formule-type étant ainsi établie et confirmée dans sa valeur par la concordance des mêmes bons résultats obtenus d'une production à l'autre, nous avons procédé à de nouveaux essais en faisant varier la proportion des substances entrant dans la composition du milieu et en modifiant sensiblement certaines des conditions de sa préparation. C'est ainsi que les variations et modifications ont porté sur les quantités de viande, de papaine, de sucres, de levure, etc., sur diverses opérations telles que temps de digestion, filtration sur papier, etc.

Nous donnons, en un tableau, le résumé succinct de certains de ces essais avec quelques détails concernant la composition et la préparation des différents lots de milieux de culture ainsi que les résultats acquis.

On constate, en examinant ce tableau, que l'on peut réduire la proportion de certains des constituants du milieu sans diminuer la production de la toxine, ce qui permet de réaliser encore d'appréciables économies.

Ajoutons que divers essais nous ont montré qu'il n'y avait pas intérêt à ajouter de la levure, même en fortes proportions, dans la cuve de porcelaine avant la digestion.

Enfin, fait curieux, dont nous poursuivons l'étude, l'addition de poudre de sang desséché qui favorise la production de la toxine tétanique (9) semble inhiber presque totalement — du moins

(9) R. LEGROUX et G. RAMON, *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 861.

NUMÉROS	TEMPS digestion	PAR LITRE					Valeur de la toxine en unités
		Viande cheval en grammes	Papaine en grammes	Levure en grammes	Sucres		
					Glucose en grammes	Maltose en grammes	
94 . . .	Prolongé.	250	1	10	2,5	6	46
98 . . .	Habituel.	250	2	5	2,5	6	40
101 . . .	Prolongé.	250	1	5	2,5	6	55
103 . . .	Habituel.	200	2	5	2,5	6	43
105 . . .	Habituel.	200	1	5	2,5	6	52
131 . . .	Habituel.	220	1,5	5	2,5	6	54
132 (1) . .	Habituel.	220	1,5	5	2,5	6	52
133 (2) . .	Habituel.	220	1,5	5	2,5	6	56
135 . . .	Habituel.	220	1,5	5	0	10	56
209 . . .	Habituel.	200	1,5	5	2,5	6	48
222 . . .	Habituel.	200	1,5	5	3	4	43
223 . . .	Habituel.	200	1,5	5	4	0	45
210 . . .	Habituel.	165	1,5	5	2,5	6	40
211 . . .	Habituel.	165	1,5	10 (3)	2,5	6	50

(1) Après addition de levure et chauffage, le bouillon a été grossièrement filtré, aussi était-il légèrement opalescent à la sortie du filtre.

(2) Après addition de levure et chauffage, le bouillon a été passé sur terre d'infusoires, après quoi, il était parfaitement limpide.

(3) Dont 5 g. ajoutés dans le ballon lui-même immédiatement avant la stérilisation.

à certains taux — la formation de la toxine diphtérique, même en présence de levure. L'addition de tapioca (10), toujours en présence de levure, paraît sans influence sur la toxinogénèse diphtérique, dans les conditions de nos expériences.

Nous n'aborderons pas plus avant, ici, l'examen du rôle de certains facteurs dans l'élaboration de la toxine diphtérique au sein de notre milieu de culture. Nous avons tenu à apporter, aujourd'hui, simplement les faits et les résultats les plus saillants obtenus au cours de nos très nombreux essais : plus de 250 en l'espace de quelques mois, rien qu'en ce qui concerne la production de la toxine de Roux et Yersin.

En résumé, et pour conclure, le milieu dont nous venons de faire connaître l'une des formules-types, et qui repose sur l'action de la papaine sur des viandes impropres à la consommation de l'homme, est d'une préparation facile, rapide, d'un prix de revient fort réduit. Adapté aux circonstances actuelles, il peut être avantageusement et surtout très économiquement substitué aux milieux à base de digestion pepsique (bouillon Martin) ou de digestion trypsique, pour l'obtention des toxines microbiennes, et en particulier pour la production en quantités importantes de la toxine

diphthérique nécessaire à la préparation de l'anatoxine destinée elle-même à la pratique maintenant généralisée de la vaccination antidiphthérique.

Notre milieu peut, en outre, convenir pour de nombreux usages bactériologiques. Sa préparation se prête, en effet, particulièrement bien à l'obtention de peptones offrant des degrés extrêmement variés de dégradation.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

## ESSAI D'IMMUNISATION PAR INJECTION D'UN PRÉCIPITÉ SPÉCIFIQUE (1)

par P. GRABÁR et J. OUDIN.

L'immunisation par des précipités spécifiques présente un intérêt tant pratique que théorique, puisqu'on peut envisager son emploi pour la vaccination, d'une part, et d'autre part, en tirer des indications utiles sur l'union des antigènes avec les anticorps, sur les groupements spécifiques de ces composés, sur les conditions nécessaires à l'antigénicité d'une substance, etc.

Selon que l'anticorps provient ou non d'un animal de la même espèce que les animaux injectés et selon que cet anticorps est combiné à un antigène complet ou à un haptène, l'injection du précipité spécifique aura des effets différents.

Si l'animal d'expérience et celui qui a fourni l'anticorps sont d'espèces différentes, l'anticorps agira en tant qu'antigène et l'animal injecté formera des anti-anticorps. Des expériences de ce genre ont permis à plusieurs auteurs (2) d'obtenir des renseignements intéressants sur les anticorps.

Par contre, lorsque les anticorps contenus dans le précipité spécifique proviennent de la même espèce animale ils seront sans doute capables, tout comme dans le cas précédent, de produire un certain degré d'immunité passive, à condition que le précipité soit dissocié dans l'organisme ou que l'anticorps soit en excès, mais ils n'auront aucune action antigénique. De ce fait, seul

(1) Ces recherches ont été entreprises en 1939, en collaboration avec notre regretté collègue et ami Georges HORNUS, mort au champ d'honneur, et n'ont pu être reprises en automne 1940 par suite du manque d'animaux.

(2) K. ANDO, R. KEE et K. MANAKO, *J. Immunol.*, 1937, **32**, 83 ; J. MARRACK D. A. DUFF, *Brit. J. exp. Path.*, 1938, **19**, 171.

l'antigène contenu dans le précipité spécifique interviendra dans l'immunisation, et l'on évitera ainsi de sensibiliser l'organisme vacciné aux composés sériques d'une espèce étrangère.

Quand l'anticorps est uni à un antigène complet, l'injection du précipité permet l'immunisation contre cet antigène et peut être envisagé comme un procédé de vaccination. Ce procédé présenterait peu d'intérêt pratique dans le cas des antigènes non toxiques et des exotoxines faciles à transformer en anatoxines. Il en présenterait davantage dans le cas de certains antigènes tels que les endotoxines glucido-lipidiques que leur toxicité et l'impossibilité de la leur faire perdre tout en conservant leur pouvoir antigénique ont dû jusqu'à présent faire écarter de la vaccination. Mais un grand nombre d'animaux est nécessaire pour pouvoir comparer statistiquement les résultats de l'immunisation par un précipité spécifique contenant un antigène complet, avec ceux de l'immunisation par le même antigène injecté seul.

Enfin un autre cas particulier est celui du précipité formé, non plus par un antigène complet, mais par un haptène et l'anticorps homologue, et c'est ce cas que nous avons étudié.

Il ne nous avait pas semblé impossible *a priori* qu'un tel précipité puisse posséder un certain pouvoir antigénique avec la spécificité du haptène. En effet, les groupements spécifiques du haptène se trouvent supportés par des complexes volumineux, ce qui est une condition de l'antigénicité. On sait que l'on peut rendre antigénique un haptène en le faisant adsorber par des particules inertes. Sans doute le haptène n'est-il pas ici fixé électivement par ses groupements spécifiques, contrairement à ce qui se passe dans son union avec l'anticorps. Afin de conserver des groupements spécifiques libres, nous avons employé dans nos essais des précipités formés dans la zone d'excès de haptène. Dans des expériences, faites il est vrai avec un antigène complet, par divers auteurs et notamment par Hartley (3), il a été constaté, en effet, que le précipité neutre ou sous-neutralisé toxine diphtérique-antitoxine est meilleur antigène que le précipité formé avec un excès d'antitoxine.

Nous avons utilisé des précipités spécifiques formés par du polysaccharide de pneumocoque type VIII et de l'immunsérum homologue de cheval (4). Ces précipités étaient formés dans la zone d'excès de haptène et lavés deux fois avec une solution physiologique de NaCl. Les animaux ont reçu cinq séries d'injec-

(3) P. HARTLEY, *Brit. J. exp. Path.*, 1926, 7, 55. Ce mémoire contient les références bibliographiques des travaux antérieurs.

(4) Ces préparations nous ont été obligeamment adressées au printemps de 1939 par M. le Professeur M. Heidelberger, de New-York. Le polysaccharide a été préparé par des méthodes récentes dans les laboratoires Squibb (n° 33 B); le sérum provient du Department of Health de la Ville de New York (Cheval n° 909, saignée du 19 janvier 1939).



tions, chaque série comportant quatre injections quotidiennes pendant quatre jours consécutifs (même dose pour les quatre injections de chaque série). Deux lapins ont reçu des suspensions de précipité spécifique dans de la solution physiologique à des doses croissantes, depuis 0,1 mg. jusqu'à 0,8 mg. de SSS VIII. Trois autres lapins ont reçu du précipité spécifique formé et lavé dans les mêmes conditions, mais mis en suspension dans une solution salée physiologique contenant une quantité de SSS VIII égale à cinq fois la teneur du précipité, cette dernière allant de 0,02 à 0,16 mg. Injections par voie intraveineuse, sauf dans les deux dernières séries (voie sous-cutanée). Saignées huit jours après la fin de la deuxième série d'injections, huit jours et deux mois après la fin de la cinquième série. Aucun de ces sérums n'a formé de précipité avec le polysaccharide.

La rareté actuelle des animaux ne nous a pas permis d'étudier d'emblée le problème sous divers aspects et nous a incités à nous attaquer à l'un des cas les plus difficiles, mais les plus probants en cas de réussite. En effet, l'immunisation contre le pneumocoque est lente et souvent malaisée, le polysaccharide est strictement dépourvu de toute antigénicité à l'égard du lapin, de plus l'injection à nos animaux d'un précipité contenant des anticorps d'espèce différente a provoqué une immunité intense contre ces éléments, et il se peut que la marche de l'expérience s'en soit trouvée gênée.

Si l'absence de pouvoir antigénique d'un précipité spécifique haptène-anticorps se trouvait confirmée par d'autres expériences, on pourrait en déduire : soit que la structure de ce complexe ne répond pas aux conditions requises pour l'antigénicité, soit qu'il ne persiste pas suffisamment longtemps dans l'organisme sous la forme combinée.

*(Institut Pasteur.)*

## BACILLE DE KOCH ET ULTRAFILTRATION

par Jean-C. LEVADITI.

En microbiologie, l'ultrafiltration est une méthode physique qui, comme l'ultracentrifugation, la radio-biologie et le microscope électronique, sert à apprécier la taille d'éléments dont le diamètre est inférieur au pouvoir séparateur du microscope. Comme elle ne peut donner aucun détail morphologique, sa précision ne saurait, dans le domaine du visible, être comparée à

celle de la mesure des dimensions obtenues à l'aide des méthodes optiques.

Rechercher le point terminal de l'ultrafiltration du bacille de Koch ne constituerait donc qu'une vérification de la valeur de cette technique si cette expérience n'avait un autre intérêt : un apport nouveau aux controverses auxquelles ont donné lieu les résultats obtenus en 1910 par Fontes au sujet de la traversée des bougies poreuses par des éléments pathogènes du bacille de Koch. Expériences à la suite desquelles il a paru possible d'émettre une hypothèse venant à l'encontre des principes de la bactériologie classique : celle de l'ultravirus tuberculeux.

Pour préciser le point terminal de l'ultrafiltration du bacille de Koch, le dispositif expérimental a été le suivant. Les bacilles de Koch de type humain [souche Ratti (1)] en culture à 37° depuis vingt et un jours sur milieu de Lœwenstein, utilisés afin de se placer dans les conditions les plus défavorables pour l'ultrafiltration (2), sont desséchés (vide sulfurique) pendant une heure et émulsionnés à la dose d'un quart de milligramme par centimètre cube en bouillon de Hartley. Cette émulsion est ultrafiltrée, par M<sup>lle</sup> Krassnoff, à l'aide de l'appareil de Grabar, à travers des membranes de Gradocol dont les diamètres moyens des pores, vérifiés à l'aide de la loi de Poiseuille, sont progressivement décroissants de 1.240 m $\mu$  à 230 m $\mu$ . Les bacilles tuberculeux sont recherchés dans chacun des liquides ultrafiltrés à l'aide des méthodes suivantes :

1. Examen microscopique de frottis colorés au Ziehl-Neelsen et effectués, soit directement avec le liquide ultrafiltré, soit après une centrifugation d'une heure à 6.000 l/m. Durée de l'examen : deux heures.

2. Ensemencement de 6 tubes de milieu de Lœwenstein à raison de X gouttes par tube.

3. Inoculation à 2 cobayes, qui reçoivent chacun 2 cc. de filtrat et sont éprouvés régulièrement à la tuberculine avant d'être sacrifiés quand ils ne réagissent pas après trois cents jours d'observation.

Enfin, après l'ultrafiltration, les membranes de Gradocol ont été fixées au Bouin, coupées et examinées au microscope, afin d'y étudier la disposition des bacilles de Koch.

Les *résultats* exposés dans le tableau ci-joint établissent que :

- 1° Toutes les membranes dont le diamètre moyen des pores est de 1.040 m $\mu$  ou supérieur à ce chiffre laissent passer les germes

(1) Cette souche a déjà été utilisée en 1924 par Valtis pour ses expériences de filtration. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 90, 1130.

(2) Nous ne nous sommes adressé ni à des crachats bacillifères, autolysés par quelques jours d'étuve à 37°, ni à des milieux de culture synthétiques, ni à des cultures telles que l'eau de pomme de terre sans glycérine, qui paraissent particulièrement favoriser la filtration sur bougie et pourront faire l'objet d'expériences ultérieures.

## Point terminal de l'ultrafiltration du bacille de Koch.

DIAMÈTRE MOYEN des pores en $\mu$	EXAMEN direct	EXAMEN après concentration par centrifugation	CULTURE sur milieu de Loewenstein	VIRULENCE pour le cobaye (1)
Emulsion avant ultrafiltration. . . . .	+	+	+	++
1290 . . . . .	+	+	+	
1140 . . . . .	+	+	+	+++
1040 (2 essais) . . . . .	—	+	+	++++
930 . . . . .	—	—	—	—
880 . . . . .	—	—	—	—
790 . . . . .	—	—	—	—
770 . . . . .	—	—	—	—
720 (3 essais) . . . . .	—	—	—	+ — — — — —
560 (2 essais) . . . . .	—	—	—	— — — — —
340 (2 essais) . . . . .	—	—	—	— — — — —
330 (2 essais) . . . . .	—	—	—	— — — — —
230 (2 essais) . . . . .	—	—	—	— — — — —

(1) Chaque signe correspond à un animal inoculé.

en quantité telle qu'ils peuvent être décelés par l'ensemble des méthodes de recherche.

2° Les membranes dont le diamètre moyen des pores est égal à 930 ou 720  $\mu$ , ou compris entre ces chiffres, n'ont permis de mettre des bacilles en évidence qu'en un cas. Il s'agit d'un seul des 6 cobayes inoculés au cours des 3 filtrations pratiquées avec la membrane de 720  $\mu$ , qui est devenu tuberculeux (3).

3° Les membranes dont le diamètre moyen des pores est inférieur à 720  $\mu$  ont retenu tout élément pathogène.

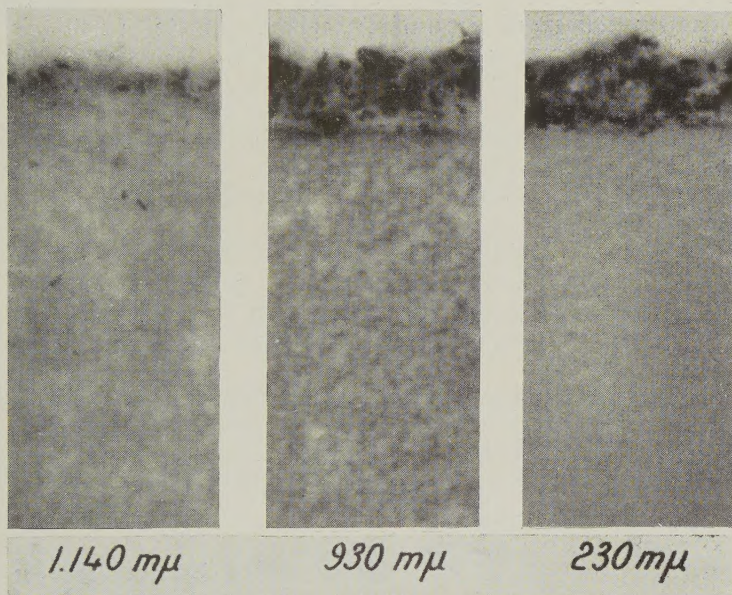
Quant à l'examen microscopique des membranes, il a montré que la structure décrite par Grabar et de Loureiro (4) est respectée après usage, bien que la face supérieure de la membrane soit recouverte d'une épaisse croûte de bacilles sous laquelle le collodion est parfois tassé par la pression. De rares bacilles sont visibles à l'intérieur des membranes de 1.140 et de 1.040  $\mu$ , et seulement près de la face supérieure. Au-dessous de ce chiffre, aucun bacille n'a pu être décelé dans la trame des membranes de plus en plus serrée, au fur et à mesure que le diamètre des pores va en décroissant (photomicrographies de M. Jeantet).

(3) Cet animal, qui a réagi à la tuberculine dès le soixante-seizième jour, a été sacrifié le cent vingt-sixième jour, porteur au point d'injection de lésions caséuses discrètes contenant des bacilles de Koch, mais sans généralisation. L'absence de toute lésion d'origine digestive ou pulmonaire ne laisse donc subsister aucun doute quant à la source de la contamination.

(4) P. GRABAR et J. A. DE LOUREIRO, *J. Chim. phys.*, 1936, **33**, 815.

D'après ces résultats, il apparaît que les bacilles de Koch, qui passent en abondance à travers la membrane de 1.040  $m\mu$ , sont complètement retenus par les membranes dont le diamètre moyen des pores est inférieur à 720  $m\mu$ . Ceci permet d'attribuer par calcul aux plus petits des éléments qui les traversent une taille de 540  $m\mu$ .

D'après les chiffres obtenus à l'aide du microscope, les tailles suivantes ont pu être attribuées au bacille de Koch : 1,5 à 3,5  $\mu$ .



Coupes de trois membranes ayant servi à ultrafiltrer des bacilles de Koch. Toutes trois sont recouvertes d'une croute de germes, mais seule celle dont le diamètre moyen des pores est de 1.140  $m\mu$  contient des bacilles dans sa trame; celles de 930 et de 230  $m\mu$  en sont dépourvues. (Photomicrographies P. Jeantet. Grossis. : 4.500 fois.)

(parfois 0,5 à 8  $\mu$  de long d'après Eastwood) sur 0,3  $\mu$  d'épaisseur (5), d'où il s'ensuit que les dimensions des formes bacillaires les plus courtes seraient de 0,5 sur 0,3  $\mu$ .

Pour les dimensions des particules les plus petites, on retrouve des chiffres identiques à l'aide des deux méthodes. Concordance telle qu'elle ne saurait être mise en discussion, même si en théorie

(5) A. CALMETTE, *L'infection bacillaire et la tuberculose*, 4<sup>e</sup> édit., Masson, 1936, p. 10.



les chiffres obtenus au microscope ne sont pas, du fait de la fixation et de la coloration, d'une rigueur absolue.

Le point terminal de l'ultrafiltration concorde-t-il avec les résultats des expériences de filtration du bacille de Koch à travers les bougies poreuses ?

Pour les expériences de filtration, les bougies utilisées furent celles de Berkefeld [Fontes (6)] et celles de Chamberland L2 [Valtis (7)] ou L3 [Vaudremer (8)].

Bien que l'on soit dans l'impossibilité de calibrer exactement les pores de ces « dégrossisseurs » que sont les bougies filtrantes, le diamètre moyen de leurs pores, calculé d'après la méthode de Grenet, serait pour la bougie Berkefeld W, la plus serrée, de 3 à 4  $\mu$  (9), pour les bougies Chamberland L2 de 2  $\mu$  et L3 de 1  $\mu$  (10).

A l'aide de la méthode de Bechhold, ce diamètre moyen varierait pour L2 et L3 entre 2 et 3  $\mu$  (11) et serait bien plus grand encore (28  $\mu$  pour L3) si l'on s'en tenait aux chiffres obtenus par Peragallo (12).

Ce qui prouve, malgré l'imprécision et le caractère relatif de ces chiffres, que le diamètre moyen des pores des bougies les plus serrées ayant permis le passage des éléments virulents est encore supérieur à celui des membranes qui ont laissé filtrer des bacilles de Koch.

Ce fait en accord avec les résultats de la centrifugation (13 et 14) et de l'électrophorèse (15) à l'aide desquelles il est possible de rassembler des bacilles acido-résistants dans les filtrats virulents ayant traversé les bougies Chamberland L2, permet les conclusions suivantes :

CONCLUSIONS. — L'ultrafiltration des bacilles de Koch, provenant de cultures sur milieu de Lœwenstein, révèle qu'au-dessous d'un diamètre moyen des pores de 720 m $\mu$ , les membranes retiennent tous les éléments virulents. Ce chiffre permet d'attribuer à ceux-ci un diamètre minimum de 0,5  $\mu$ , alors qu'au microscope en lumière blanche les dimensions des bacilles acido-résistants les plus petits seraient de 0,5 sur 0,3  $\mu$ .

(6) A. FONTES, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1910, **41**, fasc. 11, 186.

(7) J. VALTIS, *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 19.

(8) A. VAUDREMER, *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 80 et 1276.

(9) HAUDUROY, *Les Ultravirus pathogènes et saprophytes*, Masson, Paris, 1934, 12.

(10) DUCLAUX, *Cours de l'Institut Pasteur* (inédit).

(11) S. HALBERSTADT, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1021.

(12) I. PERAGALLO, *ces Annales*, 1937, **58**, 48.

(13) MARTOATMODJO, *Thèse*, Leiden, 1931.

(14) WALKER et SWEENEY, *J. inf. Dis.*, 1934, **54**, 182.

(15) H. PLOTZ, *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **99**, 387.



Le diamètre moyen des pores de la membrane la plus serrée, qui laisse passer ainsi des éléments dont la taille est supérieure à la limite de visibilité du microscope, est inférieur à celui du diamètre moyen des pores des bougies qui laissent filtrer des éléments pathogènes et qui serait de l'ordre de 1  $\mu$ .

Ces résultats, totalement concordants et conformes aux principes de la bactériologie classique, paraissent rendre inutile toute hypothèse d'« ultravirus tuberculeux » pour expliquer la traversée des bougies poreuses par des éléments virulents du bacille de Koch.

*(Institut Pasteur et Institut Alfred-Fournier.)*

---

#### PROCHAINES SEANCES

Jeudi 5 février 1942

Jeudi 5 mars 1942

En raison de la Semaine Sainte, la séance d'avril aura lieu le jeudi 9 avril 1942.

Les séances ont lieu à 16 heures, au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

